

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



REGENERAÇÃO DA BARBATANA CAUDAL EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*): UMA PERSPECTIVA BIOFÍSICA

Fernando Ricardo da Silva Ferreira

MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO
DESENVOLVIMENTO

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



REGENERAÇÃO DA BARBATANA CAUDAL EM PEIXE-ZEBRA (*DANIO RERIO*): UMA PERSPECTIVA BIOFÍSICA

Dissertação orientada pelas Prof. Doutor.
Ana Catarina Certal e Sólveig Thorsteinsdóttir

Fernando Ricardo da Silva Ferreira

MESTRADO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA E DO
DESENVOLVIMENTO

2011

Agradecimentos | i

Oh... agradecimentos, agradecimentos; altura em que se põe o cérebro a fervilhar por razões menos científicas e mais morais, reflectindo um momento de expansão e libertação emocional por marcar o fim da grande aventura de aspirar a mestre.

Por vezes e essencialmente no início desta demanda fiquei com a ideia que ia apenas fazer agradecimentos só por o fazer, por fazer parte do respeito e moralidade individual para com um colectivo. Felizmente tal não me aconteceu e assim vou agradecer de peito aberto a todos aqueles que contribuíram para ultrapassar sem pesar e com alegria este degrau da escada da vida!

Começo pelo início, com uma palavra de apreço ao professor Élio Sucena que me ligou a avisar da entrada singular na segunda fase do mestrado, quando vivia um mau momento devido à incerteza da entrada num lugar desejado. Outra palavra por me ter indicado uma residência provisória com um colega de mestrado que me abrigou confortavelmente até à minha bem sucedida e realizada entrada e passagem pela residência universitária Tomás Ribeiro (RUTR), a quem (casa e colegas) deixo um agradecimento especial pelos bons e diversificados momentos.

Depois disto devo, ou melhor, quero agradecer à Catarina Certal por tão prontamente me aceitar e integrar num projecto que desde cedo me entusiasmou. De referir também o Joaquín León, chefe do laboratório de organogénese do IGC, que após me acolher no seu laboratório aconselhou-me neste mundo da ciência completamente novo para mim.

Antes de terminar, um grande agradecimento a toda a equipa do laboratório: Raquel Tomás, Joana Monteiro, Rui Castanhinha, Teresa Gomes, Rita Aires, Rita Félix e Diana Pires, pelo à-vontade na adaptação, pela ajuda técnico-científica no desenrolar deste projecto e também na luta sempre difícil contra desilusões e ilusões, frustrações e motivações. Um obrigado especial a quem mais me acompanhou e ensinou, Joana Monteiro e Teresa Gomes, em técnicas completamente ignoradas, e à Raquel Tomás que me transmitiu aquilo que encaro como uma boa maneira de estar num laboratório. Aqui fica uma alusão extranatural ao lembrar-me de uma cave em concreto do IGC (com o equipamento mais usado neste projecto), onde sozinho passei grande parte do tempo e que, por isso, me “aturou” nos melhores e piores momentos.

Um momento de gratidão para com os membros do grupo do Moisés Mallo e ao próprio, com quem partilhei o espaço e também as vicissitudes e idiossincrasias do trabalho experimental.

Um agradecimento à professora Sólveig Thorsteinsdóttir que aceitou ser a minha orientadora interna e que juntamente com a Catarina Certal, orientadora externa, me deu conselhos e partilhou a sua experiência na leitura da presente dissertação.

Em última análise, nem tudo foram maravilhas mas o saldo final é bastante positivo em relação às pessoas e às entidades IGC e FCUL.

Alan Shipley foi uma das pessoas que mais me marcou no decurso deste projecto por me provar que não é preciso muito tempo de relacionamento para se querer escutar, com muita atenção, conselhos que incorporavam em si próprios conhecimento pela pessoa, ciência e mundo.

Apesar dos esforços os agradecimentos são sempre aquela parte em que pensámos “espero não me esquecer de ninguém”, mas a cada nova leitura adicionamos um(a) e exclamamos “como é que eu me ia esquecer de agradecer a ele/ela!”, mas como quase de certeza vou-me esquecer de alguém, lamento tal omissão que adoraria evitar.

Da mesma maneira, uma palavra de consideração a todos os cientistas que nos últimos três séculos têm tão dedicadamente contribuído para a conquista em conhecimento de terra ao mar na sempre inspiradora biologia da regeneração, e um perdão pela não inclusão dos seus trabalhos por limitações de espaço e/ou por afunilamento da tese.

Poucos agradecimentos valem por si sem uma menção honrosa à família, com um agradecimento quase platónico de quem percebe que sem ela não estaria certamente aqui. Grande família em número e qualidades eu tenho e com ela me despeço...



Sem o que referi, esta dissertação não seria possível. Terminando com nostalgia e saudade...

“As verdadeiras conquistas, as únicas de que nunca nos arrependemos, são aquelas que fazemos contra a ignorância.”

Napoleão Bonaparte

Lista de Abreviaturas | ii

AEC	capa epitelial apical
ASET	<i>automated scanning electrode techniques</i>
AVD	diminuição do volume por apoptose
BMP	proteína morfogénica do osso
BTS	sulfonamida de N-benzil-p-tolueno
C/E	centro da barbatana (intersecção dorso-ventral)/extremidade da barbatana
Ci-VSP	fosfatase com sensor de voltagem
Cl⁻/Na⁺	iões cloreto/sódio
D/V	eixo dorso-ventral
D1	corte distal cerca de 2 segmentos antes da bifurcação
D2	corte distal cerca de 2 segmentos depois da bifurcação
DP/PB	blastema distal/proximal
EF	campo eléctrico lateral
EGF	factor de crescimento endotelial
FGF	factor de crescimento de fibroblastos
H⁺/K⁺/Ca²⁺	iões protões/potássio/cálcio
hpa	horas pós-amputação
ICl_n	canal de cloreto activado por aumento de volume
LIX	permutador de iões líquido
mpa	minutos pós-amputação
Na_v	canais de sódio sensíveis a voltagem
NRF-2	factor-2 respiratório nuclear
P	corte proximal, 3-5 segmentos do pedúnculo
P/D	eixo proximo-distal
PBT	solução salina tamponada com fosfato (PBS) + <i>tween</i>
PFA	paraformaldeído
PI3Kg	fosfatidilinositol-3-OH cinase-g
PTEN	fosfatase lipídica supressora de tumores
R/IR	raio/inter-raio
RA	ácido retinóico
SDF-1	factor-1 derivado de células do estroma
SHH	factor <i>sonic hedgehog</i>
SIET	técnica de microsonda vibrátil específica de ião
SVET	técnica de microsonda vibrátil de voltagem
TEP	potencial transepitelial
VEGF	factor de crescimento de endotélio vascular
WE	epitélio de ferida
WNT	factor <i>wingless integrated</i>

Lista de Figuras | iii

- Fig. 1** *Estrutura da barbatana caudal de peixe-zebra*
- Fig. 2** *Fases da regeneração da barbatana caudal em peixe-zebra*
- Fig. 3** *Principais vias de sinalização que regulam a regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra*
- Fig. 4** *Potencial transepitelial (TEP), formação do potencial de ferida e consequente campo eléctrico (EF) lateral, após uma ferida em epitélios de diferentes sistemas animais*
- Fig. 5** *Desenho experimental dos ensaios efectuados neste estudo*
- Fig. 6** *Ensaio de despistagem para quantificar a possível difusão de Cl^- do eléctrodo de referência*
- Fig. 7** *Fontes artificiais de Cl^- e Na^+*
- Fig. 8** *Dispositivo de medição dos fluxos de Cl^- e Na^+*
- Fig. 9** *Eléctrodos usados na SVET*
- Fig. 10** *Sistema experimental criado para a inibição farmacológica de canais de cloreto sensíveis ao volume (ICl_n) com aciclovir*
- Fig. 11** *Ensaio farmacológico dos canais de sódio sensíveis a voltagem (Na_v)*
- Fig. 12** *Perfil de fluxos extracelulares de Cl^- e Na^+ ao longo da regeneração da barbatana*
- Fig. 13** *Padrão de centro (C)/extremidade (E) e proximal (P)/distal (D)*
- Fig. 14** *Questões emergentes da análise dos perfis de Cl^- e Na^+ e que podem ser mais rapidamente respondidas pela medição das densidades de corrente ao longo da regeneração da barbatana*
- Fig. 15** *Equivalência temporal das diferentes fases de regeneração entre peixe-zebra e Xenopus*
- Fig. 16** *Ensaio de despistagem da tricaína e da concentração de Na^+*
- Fig. 17** *Perfil preliminar da expressão génica do canal de cloreto sensível à voltagem (ICl_n) ao longo da regeneração*
- Fig. 18** *Análise farmacológica preliminar dos canais de sódio sensíveis à voltagem (Na_v) e dos canais de cloreto sensíveis ao volume (ICl_n), respectivamente, por tricaína e aciclovir*
- Fig. 19** *Perfil expectável das resistências/resistividades em função da ausência/presença/diferenciação de estruturas epiteliais ao longo da regeneração*
- Fig. 20** *Modelo bioeléctrico da regeneração*

O peixe-zebra (*Danio rerio*) regenera vários órgãos, o que o torna um excelente modelo para estudos de regeneração.

Partindo de uma hipótese biofísica onde fluxos iónicos e correntes associadas são considerados eventos epigenéticos à regeneração, determinou-se o perfil de fluxos extracelulares dos iões cloreto e sódio na barbatana caudal durante as diferentes fases da regeneração. Como esperado, imediatamente após a amputação observou-se uma saída massiva destes iões. Após o fecho da ferida, ambos os perfis de fluxos de cloreto e sódio revelaram padrões dinâmicos que acompanham a regeneração. Embora não tenha sido detectado qualquer influxo de sódio durante e após a formação do blastema, como postulado noutros sistemas, a inibição farmacológica de canais de sódio perturbou a regeneração, indicando que este ião é importante no mecanismo. Dada a ausência de influxo de sódio, o efluxo de cloreto emergiu assim como provável responsável pela corrente de entrada característica dos sistemas regenerantes. Foram ainda detectados três padrões bioeléctricos interessantes: (1) um padrão raio/inter-raio; (2) um possível padrão centro/extremidade da barbatana; e (3) uma diferença do padrão de fluxos entre amputação proximal e distal. Estes padrões poderão conter informação mitogénica e morfogénica.

Estes resultados parecem apoiar a ideia de que os mecanismos bioeléctricos têm um papel importante e conservado na regulação da regeneração.

Palavras-chave

Regeneração; Dinâmica iónica; Expressão genética; *Danio rerio*.

Zebrafish (*Danio rerio*) regenerates several organs, rendering it an excellent regeneration model.

Starting from a biophysical hypothesis where ionic fluxes and associated currents are considered epigenetic events to regeneration, the extracellular flux profiles for chloride and sodium were determined in the caudal fin during different stages of regeneration. As expected, immediately after amputation there was a massive outflow of these ions. After wound closure, both profiles of chloride and sodium fluxes showed dynamic patterns that accompany regeneration. Although no sodium influx was detected during and after blastema formation, as postulated in other systems, pharmacological inhibition of sodium channels perturbed regeneration, pointing to a role for this ion in the regeneration mechanism. Given the absence of sodium influx, chloride efflux thus emerges as the putative ion responsible for the inward current characteristic of regenerating systems. Three interesting bioelectric patterns have been detected: (1) a pattern ray/inter-ray; (2) a possible pattern center/extremity of the fin; and (3) a difference in the pattern of fluxes between the proximal and distal amputation. These patterns may contain mitogenic and morphogenic information.

These results seem to support the idea that the bioelectric mechanisms do play an important and conserved role in regulating regeneration.

Key words

Regeneration; Ion dynamic; Gene expression; *Danio rerio*.

i Agradecimentos	iii
ii Lista de abreviaturas	vi
iii Lista de figuras	vii
iv Resumo	viii
Palavras-chave	viii
v Abstract	ix
Key words	ix
vi Índice	x
1 Introdução	1
1.1 Regeneração das extremidades de vertebrados, o peixe-zebra como modelo	1
1.2 A contribuição bioelétrica no desencadeamento da regeneração	3
1.3 A bioelectricidade durante o processo regenerativo	5
1.4 Bioelectricidade e comportamento celular	6
1.5 Transdução do sinal bioelétrico em genético	6
1.6 Síntese das evidências fisiológicas da bioelectricidade na regeneração	7
1.7 Hipótese biofísica da regeneração	7
2 Materiais e Métodos	8
2.1 Linhas de peixe-zebra e cirurgia	8
2.2 Técnica de microsonda vibrátil específica de ião, SIET (do inglês Scanning Ion-selective Electrode Technique)	9
2.2.1 Fundamento da técnica	9
2.2.2 Construção do microelétrodo	9
2.2.3 Dispositivo experimental	11
2.2.4 Períodos temporais	12
2.2.5 Aquisição e tratamento de dados	12
2.2.6 Análise estatística	12
2.3 Técnica de microsonda vibrátil de voltagem, SVET (do inglês Scanning Vibrating Electrode Technique)	12
2.3.1 Fundamento da técnica	12
2.3.2 Preparação dos microelétrodos	13
2.3.3 Dispositivo experimental	13
2.3.4 Períodos temporais	14
2.3.5 Aquisição e tratamento de dados	14
2.4 Hibridação in situ	14
2.5 Modulação farmacológica com aciclovir e tricaína	15
2.5.1 Desenho experimental da inibição de ICl_n com aciclovir	15
2.5.2 Desenho experimental da inibição de Na_v com tricaína	15
2.5.3 Taxa regenerativa	16
3 Resultados	17
3.1 Análise descritiva	17
3.1.1 Perfil global da dinâmica iônica de cloreto e sódio e da densidade de corrente	17
3.1.2 Perfil específico da dinâmica de cloreto e de sódio e da densidade de corrente no raio/inter-raio	17

3.1.3 Perfil específico de fluxos de cloreto e sódio e da densidade de corrente no centro/extremidade e proximal/distal	19
3.1.4 Ensaios de despistagem da tricaína e da concentração de sódio	21
3.1.5 Análise da expressão génica de ICl_n	22
3.2 Análise funcional	22
3.2.1 Inibição farmacológica de ICl_n com aciclovir	22
3.2.2 Inibição farmacológica de Na_v com tricaína	23
4 Discussão	25
4.1 Bioelectricidade e os eventos chave da regeneração	25
4.1.1 Conceitos de fluxo iónico passivo e activo no contexto bioeléctrico	25
4.1.2 Resistência diferencial durante a regeneração, que papel?	25
4.1.3 Potencial de ferida, campo eléctrico lateral e a iniciação da regeneração	26
4.1.4 Reversão do padrão dos fluxos entre o raio e o inter-raio no início da regeneração	27
4.1.5 Recuperação do potencial transepitelial	27
4.1.6 6 hpa, período-chave da regeneração?	27
4.1.7 Formação e maturação do blastema: previstos bioelectricamente?	29
4.2 Padrões de fluxos raio vs inter-raio, centro vs extremidade e proximal vs distal, que papel?	29
4.3 Modelo bioeléctrico da regeneração	30
4.4 Perspectivas futuras	31
5 Bibliografia	33
a Anexos	i

Introdução | 1

A regeneração é o processo através do qual, após amputação, autotomia ou doença, um organismo pode readquirir função ao nível das células, dos tecidos, dos órgãos, das estruturas e até do organismo inteiro (Stoick-Cooper *et al.*, 2007b; Bely e Nyberg, 2009). A regeneração animal pode ser: (1) mediada por células estaminais (*e.g.*, sangue); (2) compensatória (*e.g.*, fígado); (3) morfolaxia (*e.g.*, hidra); e (4) epimórfica, ou uma combinação dos dois últimos mecanismos. A regeneração epimórfica é característica das extremidades/apêndices de artrópodes, anfíbios, répteis e peixes. Este tipo de regeneração envolve a formação de um blastema, agregado de células tipo mesenquimatoso altamente proliferativas que forma uma estrutura autónoma, transitória e conservada evolutivamente responsável pelo crescimento *de novo* da porção perdida (Gilbert, 2006; Brockes e Kumar, 2008; Ferreira, 2008; Bely e Nyberg, 2009; Poss, 2010).

1.1 Regeneração das extremidades de vertebrados, o peixe-zebra como modelo

Um dos problemas no estudo da regeneração reside na distribuição muito heterogênea entre os vários modelos animais, o que gera limitações em aspectos essenciais como ferramentas genéticas e moleculares. É o caso do tritão que ainda não tem o genoma sequenciado, apesar de ter sido um dos modelos mais usados por ter impressionantes capacidades regenerativas (Han *et al.*, 2005). Por outro lado, o modelo animal deste estudo, o peixe-zebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) é muito usado em estudos de desenvolvimento, tendo muitas ferramentas genómicas, moleculares e celulares disponíveis (*e.g.*, sequenciação completa do genoma). O peixe-zebra adulto tem a capacidade de regenerar as escamas, o nervo óptico, a espinal medula, o coração e as barbatanas, o que o torna num excelente modelo de regeneração (Alvarado e Tsonis, 2006).

A barbatana caudal do peixe-zebra é a estrutura mais utilizada para estudos de regeneração, por ser uma estrutura externa, não vital, de fácil acesso, relativamente simples e simétrica (permite desenhos experimentais com tratamento e controlo no mesmo espécimen), e com a maioria dos tecidos excepto músculo-esquelético (Fig. 1). Apesar da desdiferenciação de miotubos ser uma importante fonte celular para o blastema em urodelos, o músculo não é necessário para a regeneração em si, mas para formar o próprio músculo (Holder, 1989; Han *et al.*, 2005).

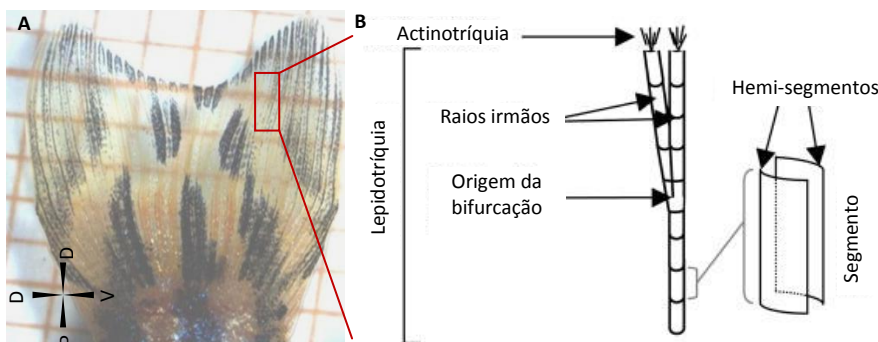


Fig. 1 Estrutura da barbatana caudal de peixe-zebra A Barbatana caudal simétrica, lóbulos dorsais e ventrais iguais, e com alternância raio/inter-raio característica. B Esquema do esqueleto dérmico. Lepidotríquia, exosqueleto regenerante de vários raios ósseos de origem dérmica por mineralização directa, ligados por ligamentos ao endosqueleto não regenerante, de origem cartilaginosa. Cada segmento de raio

tem dois hemi-segmentos opostos que englobam vasos sanguíneos arteriais, fibras nervosas e tecido conjuntivo. O raio separa-se em dois raios irmãos na origem da bifurcação. Os raios são relativamente paralelos e interligados por tecido mole que contém os vasos sanguíneos venosos – inter-raio. Actinotríquia, fibras não mineralizadas de elastoidina na extremidade dos raios. Canto inferior direito de A: eixos da barbatana caudal, P/D – proximo-distal; D/V – dorso-ventral. Fotografia da barbatana, cortesia de Joana Monteiro (A); adaptado de Akimenko *et al.*, 2003 (B).

Por razão desconhecida, nos teleósteos a regeneração é dependente da temperatura, sendo que a 30-33 °C esta ocorre em quase metade do tempo que a 25-28 °C (Johnson e Weston, 1995; Poss *et al.*, 2003). A regeneração da barbatana é um processo relativamente rápido que, a 30-33 °C, dura cerca de duas semanas, estando dividida em quatro fases: (1) 0-12 horas pós-amputação (hpa), fecho da ferida (com formação do epitélio de ferida (WE, do inglês *wound epithelium*) e da capa epitelial apical (AEC, do inglês

apical epithelial cap)); (2) 12-24 hpa, formação do blastema primário; (3) 24-48 hpa, maturação do blastema – divisão em blastema proximal e distal (PB/DB, do inglês *proximal/distal blastema*); (4) >48 hpa, crescimento regenerativo (Poss *et al.*, 2003; Fig. 2).

Os processos de regeneração epimórfica em peixe-zebra são muito semelhantes aos dos modelos animais mais usados, tritões, salamandras e rãs. Após amputação existe pouca hemorragia e inflamação, e a rápida hemostasia (coágulo de plasma) cria uma rede de fibras de colagénio, sobre a qual células epiteliais adjacentes (nos anfíbios são estaminais basais (Han *et al.*, 2005)) migram e reorganizam-se cobrindo a superfície de ferida e formando o WE (1-3 camadas (Christensen e Tassava, 2000)). Após novas vagas de migração forma-se AEC. A formação de ambas as estruturas epiteliais transientes não requer proliferação (Poleo *et al.*, 2001; Santos-Ruiz *et al.*, 2002), que apenas começa na epiderme proximal ao nível de amputação por volta das 24 hpa, sendo muito pouco ou nada detectada na AEC (camada basal) e no blastema (com forte proliferação a partir das 48 hpa) (Poleo *et al.*, 2001). Subsequentemente, por sinais ainda não totalmente entendidos, mas provavelmente produzidos pelo recém-formado WE/AEC (Campbell e Crews, 2008), o tecido conjuntivo até dois segmentos da ferida torna-se de tipo mesenquimatoso, *via* desdiferenciação e as células reorganizam-se formando o blastema primário. Sendo ainda controverso pode também existir a intervenção de células estaminais (como as pigmentares) na formação/constituição do blastema (Poss *et al.*, 2003; Akimenko *et al.*, 2003), tal como nos urodelos (Han *et al.*, 2005; Morrison *et al.*, 2006). De referir que amputações proximais e distais levam aproximadamente o mesmo tempo a regenerar (tal como nos urodelos (Spallanzani, 1769) e noutros peixes (Morgan, 1906)) e tal parece estar associado ao blastema significativamente maior formado no primeiro caso, possivelmente devido a um gradiente próximo-distal da via de sinalização Fgf (Lee *et al.*, 2005). Dada a estrutura da barbatana, existem tantos blastemas quantos raios (possibilitando a sua regeneração individual caso seja só um raio lesado). No entanto, existe controvérsia sobre a existência de blastemas nos inter-raios (Murciano *et al.*, 2001; 2002; Marí-Beffa e Murciano, 2010). Não obstante, a unidade de regeneração ao contrário do que se pensava não é o raio, por cada um poder regenerar independentemente dos outros (Nabrit, 1929), mas o hemi-raio, por regenerar sem a parte contra-lateral (Akimenko *et al.*, 2003). A maturação do blastema primário forma o blastema proximal e distal. O DB consiste em células sem ou com lenta proliferação e o PB é altamente proliferativo, começando a haver diferenciação na zona imediatamente proximal ao PB – zona de padronização (ou diferenciação). No início do crescimento regenerativo, muitas vezes classificado neste e noutros sistemas como a fase do redesenvolvimento/repadronização por usar as mesmas vias de sinalização do desenvolvimento (recapitulação do desenvolvimento), existem então estas três estruturas. Esta fase corresponde ao pico da taxa proliferativa em todo o processo (muito maior que na fase da formação do blastema), o que pode indicar o tempo necessário para a organização do blastema e preparação para esta última fase (Poss *et al.*, 2003). Ao contrário da regeneração dos membros de urodelos (Han *et al.*, 2005), o regenerado da barbatana não é uma cópia exacta do original, embora apresente o mesmo tamanho final. Um a três segmentos intercala ao nível da amputação (Poss *et al.*, 2003; Akimenko *et al.*, 2003).

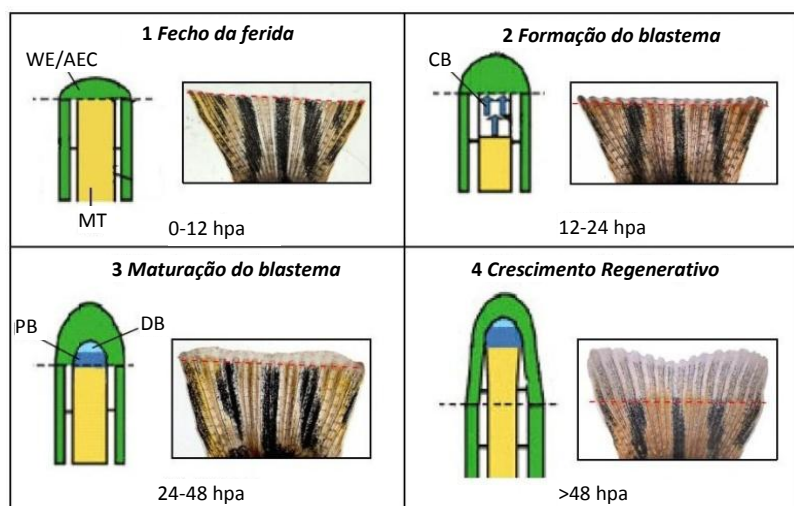


Fig. 2 Fases da regeneração da barbatana caudal em peixe-zebra A regeneração pode ser dividida em quatro fases: **1** 0-12 horas pós-amputação (hpa), fecho da ferida. Formação do epitélio de ferida (WE) e da capa epitelial apical (AEC) por migração de células epiteliais; **2** 12-24 hpa, formação do blastema primário. A AEC engrossa e o tecido mesenquimatoso entre os hemi-raios desorganiza-se e as células migram distalmente formando uma massa de células proliferativas, o blastema; **3** 24-48 hpa, maturação do blastema. Formação do blastema proximal e distal (PB/DB), com proliferação praticamente restrita ao PB; **4** >48 hpa, crescimento regenerativo. As células do blastema proliferam, diferenciam-se e padronizam-se para restaurar as estruturas perdidas. Linhas tracejadas a preto

e vermelho – plano de amputação. MT – tecido mesenquimatoso; CB – células do blastema; DB – blastema distal; PB – blastema proximal. Cortesia de Joana Monteiro, adaptado de Poss *et al.* (2003).

A expressão génica nos tecidos em regeneração altera-se ao longo do processo regenerativo. Uma das vias mais precoces para a regeneração da barbatana é a via Wnt/ β -catenina, activa no WE/AEC, presumivelmente para facilitar a migração. Na segunda fase existe sobre-expressão de *msxb* e *msxc* (marcadores do blastema), que promovem a desdiferenciação e manutenção do estado indiferenciado. Entre os genes possivelmente envolvidos na formação do blastema incluem-se *wnt10* expresso 6 hpa no WE/AEC e *fgfr1* expresso no DB que estimulam e mantêm a proliferação. Genes como *shh* e *bmp4* são importantes e conservados evolutivamente na padronização das estruturas perdidas, juntamente com o ácido retinóico (RA) (Poss *et al.*, 2003; Akimento *et al.*, 2003; Stoick-Cooper *et al.*, 2007b; Fig. 3).

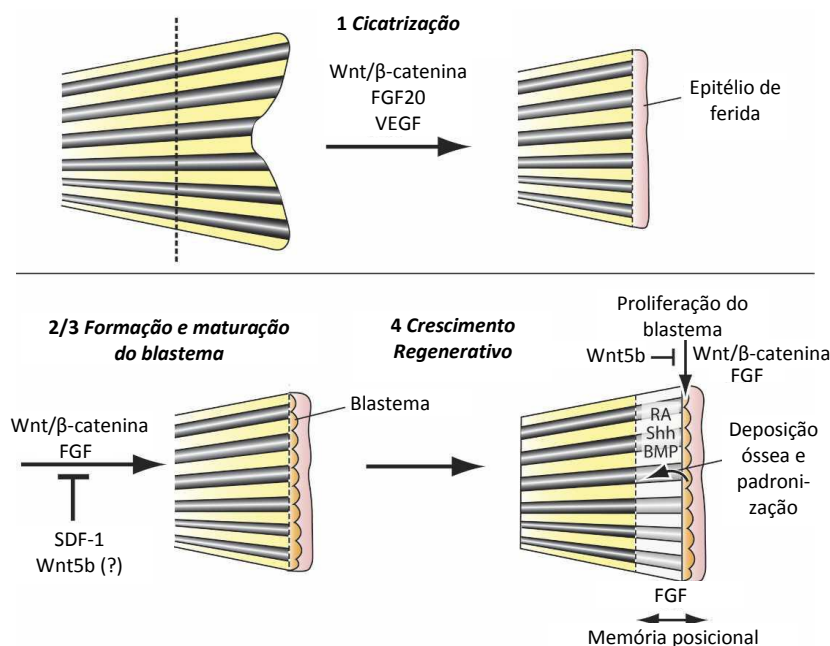


Fig. 3 Principais vias de sinalização que regulam a regeneração da barbatana caudal de peixe-zebra A regeneração ocorre em quatro fases: **1** o fecho da ferida e a formação do WE/AEC envolvem a sinalização Wnt/ β -catenina e Fgf. É necessária sinalização por VEGF para a angiogénese que se inicia nesta fase; **2/3** permanecem a sinalização Wnt/ β -catenina e Fgf. SDF-1 (Dufourcq e Vríz, 2006) e Wnt5b (Stoick-Cooper *et al.*, 2007a) podem agir como reguladores negativos da formação do blastema; **4** sinalização Wnt/ β -catenina e Fgf ainda necessárias e Fgf é também necessário para a memória posicional (Lee *et al.*, 2005). Shh, BMP e RA participam na padronização óssea e *wnt5b* é um regulador negativo do crescimento regenerativo. Adaptado de Stoick-Cooper *et al.* (2007b).

1.2 A contribuição bioeléctrica no desencadeamento da regeneração

Apesar do estudo da regeneração já ter cerca de três séculos ainda se desconhecem grandemente os sinais iniciadores. Tais sinais, quer bioquímicos quer biofísicos, podem surgir imediatamente após a amputação. Os primeiros têm sido mais explorados e consistem em genes-mestre, enquanto os segundos reemergiram recentemente e estão largamente por estudar. O rápido fecho da ferida tem as vantagens de minimizar o tecido danificado, a infecção e, consequentemente a resposta inflamatória, ao mesmo tempo que promove uma rápida estabilização do microambiente da ferida (Han *et al.*, 2005). Não são ainda bem conhecidos quais os sinais que induzem a migração epitelial para cobrir a ferida – primeiro evento fenotípico da regeneração. No entanto, estão presentes duas respostas iniciais à ferida: activação do sistema imunitário inato e formação de um potencial de ferida com consequente criação de um campo eléctrico lateral (EF, do inglês *electrical field*). Os sinais que regulam esta resposta são assim possíveis iniciadores de processos regenerantes (Stoick-Cooper *et al.*, 2007b). Esta dissertação centra-se essencialmente no segundo aspecto, no entanto, pouco se sabe sobre o papel os constituintes do sistema imunitário inato na iniciação da regeneração (Kimura *et al.*, 2003; Stoick-Cooper *et al.*, 2007b).

Graças aos contributos de Luigi Galvani, desde os finais do século XVIII que se reconhece a existência de “electricidade animal”, cujas componentes de estudo se podem dividir em electrofisiologia clássica e bioelectricidade. A electrofisiologia clássica estuda alterações de voltagem transientes, rápidas e auto-regeneradas através da membrana plasmática de células excitáveis (potenciais transientes e potenciais de acção); por outro lado a bioelectricidade consiste em gradientes de voltagem ou campos eléctricos estáveis, duradouros, de corrente contínua, induzidos entre os espaços exteriores e interiores de células e tecidos (McCaig *et al.*, 2005; 2009; Levin, 2007; 2009). Para induzir um potencial de acção é necessário $1-2 \text{ V} \cdot \text{mm}^{-1}$ enquanto EFs com relevância fisiológica situam-se entre $1-100 \text{ mV} \cdot \text{mm}^{-1}$ (McCaig *et al.*, 2005). Ambos os fenómenos eléctricos são gerados por translocadores proteicos – canais, transportadores e bom-

bas – e respectivos reguladores nas membranas nuclear, organelar e plasmática. Outros agentes são as junções celulares ocludentes e de hiato, que definem a resistência eléctrica nos epitélios (Azevedo, 2005). Assim, durante a regeneração são vários os agentes candidatos a poderem ter papéis importantes.

Os sistemas de transporte funcionam de forma integrada para manter a homeostasia em consequência de mecanismos de regulação (*e.g.*, controlo do volume (Hoffmann *et al.*, 2009), do aporte de energia (*e.g.*, ATP, processos redox e manutenção de gradientes iónicos) e de substratos (*e.g.*, glicose)) (Azevedo, 2005). No estado basal as células estão em equilíbrio de Gibbs-Donnan, onde nos lados intracelular e extracelular: (i) o produto dos iões difusíveis é o mesmo; (ii) há electroneutralidade; e (iii) há, com excepção dos rins, isotonicidade (equilíbrio osmótico). Assim, um fluxo de um determinado ião leva necessariamente ao movimento de outro(s) para recuperar a homeostasia (Hoffmann *et al.*, 2009). Concordantemente, as células e tecidos não podem ter apenas translocadores específicos, estes têm também de ter uma distribuição espacial específica. Isto é bem elucidado nos seguintes casos: (i) em *sensu stricto*, na migração celular como co-opção dos mecanismos de regulação de aumento ou diminuição de volume (Hoffmann *et al.*, 2009) e na necessidade de assimetria de bombas de protões/potássio (H^+/K^+ -ATPase) no estabelecimento precoce da assimetria esquerdo/direito no embrião (Levin *et al.*, 2002); e, (ii) em *sensu lato*, no modelo da subdivisão geométrica da célula levando à criação de microdomínios bioeléctricos bidimensionais diferenciais (não isotrópicos) que permitiriam à membrana, tal como nos epitélios, reter uma grande quantidade de informação (Levin, 2007).

As características dos epitélios, células justapostas seladas com junções ocludentes e comunicando por junções de hiato, tornam-nos nuns dos exemplos melhor estudados no que se refere à distribuição de translocadores. Os epitélios possuem uma distribuição assimétrica apical-basolateral típica de translocadores iónicos (Koefoed-Johnsen e Ussing, 1958; Tyler, 2003) originando transportes transcelulares unidireccionais, que são muito importantes no estudo dos fenómenos bioeléctricos associados à regeneração (McCaig *et al.*, 2005; 2009). A concentração de canais ou outros transportadores de sódio na parte apical e bombas de sódio/potássio (Na^+/K^+ -ATPases) e canais de potássio na parte basolateral gera um transporte direccionado e selectivo que acumula diferencialmente cargas positivas no interior do epitélio, gerando o potencial transepitelial (TEP, do inglês *transepithelial potential*). Pode-se assim considerar o TEP como uma “bateria biológica” (McCaig *et al.*, 2005; 2009; Stewart *et al.*, 2007).

Uma ferida altera as características eléctricas do epitélio, deixando de haver resistência na zona e gerando-se um curto-circuito local do TEP. Isto permite um derrame de iões a favor do gradiente electroquímico (saída de cargas positivas em feridas epiteliais). Este derrame de iões gera o chamado potencial de ferida e também um gradiente de voltagem lateral (campo eléctrico lateral) que enfraquece distalmente e persiste até à regeneração do epitélio com a reposição das condições eléctricas pré-existentes (Nuccitelli *et al.*, 2004; 2008; McCaig *et al.*, 2005; 2009; Stewart *et al.*, 2007; Dubé *et al.*, 2010). Quer o potencial de ferida quer o EF são vectores com magnitude e direcção (cátodo no centro da ferida), tornando-os um possível candidato a organizador espacial. Além disto, os fluxos e o gradiente de voltagem podem variar no espaço e no tempo, consoante a distribuição dos canais e das resistências locais (McCaig *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos de bioelectricidade foi realizada em anfíbios (TEP de ≈ 100 mV; McCaig *et al.*, 2005). No entanto e apesar das diferenças no epitélio em peixes (Rakers *et al.*, 2009), os mecanismos parecem semelhantes dada a conservação da polaridade epitelial (Tyler, 2003), embora existam apenas medições directas incipientes do TEP em salmões (≈ 22 mV; Iwata *et al.*, 1987) e do potencial de ferida em peixe-zebra (Huang e Cormie *et al.*, 2008). Também nos mamíferos a formação do TEP (10-60 mV; Dubé *et al.*, 2010) e o potencial de ferida se regem por mecanismos semelhantes (Reid *et al.*, 2005; Nuccitelli *et al.*, 2004; 2008), indicando a conservação deste fenómeno (Fig. 4).

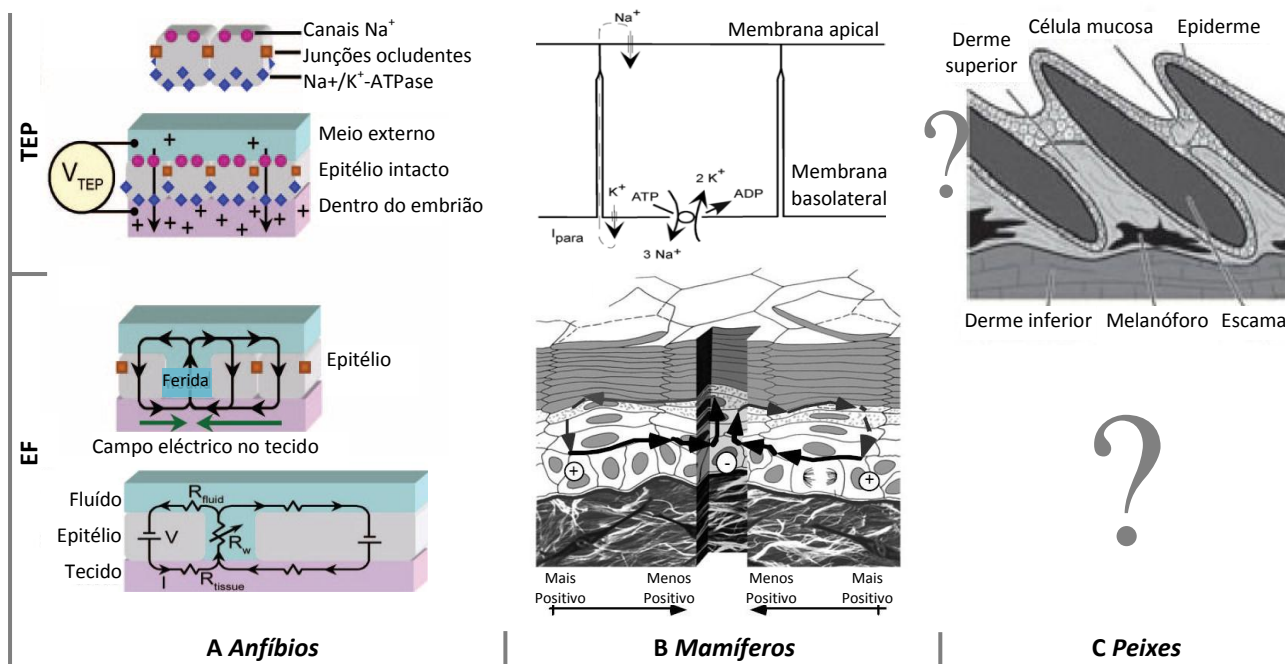


Fig. 4 Potencial transepitelial (TEP), formação do potencial de ferida e consequente campo eléctrico (EF) lateral, após uma ferida em epitélios de diferentes sistemas animais **A** Epitélio de anfíbios com a polaridade apical-basolateral definida por diferentes translocadores. TEP de ≈ 100 mV. **B** Epitélio de mamíferos, semelhante ao de anfíbios. TEP de 10-60 mV. **C** Epitélio de peixes, não se conhecem os mecanismos envolvidos na manutenção do TEP, na formação do potencial de ferida e EF. TEP de ≈ 22 mV em salmão. Adaptado de McCaig *et al.*, 2005 (**A**); Nuccitelli *et al.*, 2008 (**B**) e Rakers *et al.*, 2009 (**C**).

Esta resposta inicial à ferida/amputação (formação de um potencial de ferida e campo eléctrico lateral) foi detectada parcialmente em resultados preliminares em peixe-zebra como um efluxo de potássio (Joana Monteiro, comunicação pessoal). Tal dinâmica iónica fixa o cátodo na ferida, devido à saída de cargas positivas, e o ânodo distalmente à ferida. Esta resposta eléctrica é a responsável pela galvanotaxia (migração em campos eléctricos) e galvanotropismo (crescimento em campos eléctricos) catódicos das células epiteliais adjacentes em diversos modelos animais (Reid *et al.*, 2005; McCaig *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Huang e Cormie *et al.*, 2008; Zhao, 2009). Em peixe-zebra demonstrou-se que os queratócitos migram para o cátodo devido à electro-osmose de integrinas (Huang e Cormie *et al.*, 2008). Esta corrente de saída em sistemas não regenerantes decresce lentamente à medida que a ferida fecha enquanto em sistemas regenerantes a polaridade positiva é invertida para a polaridade negativa, com o pico de voltagem coincidente com o período de máxima proliferação celular (Borgens *et al.*, 1977b; Levin, 2007; Reid *et al.*, 2009). Reid *et al.* (2005) também sustenta uma relação entre proliferação e EF, com o plano de divisão a depender da orientação do campo (Zhao *et al.*, 1999).

Pela primeira vez a base molecular desta migração foi descrita revelando um mecanismo assente na actividade das enzimas fosfatidilinositol-3-OH-cinase-g (PI3Kg, indutora) e fosfatase lipídica supressora de tumores (PTEN, inibidora) (Zhao *et al.*, 2006). Foi também descoberta em ascídias a primeira fosfatase com sensor de voltagem (Ci-VSP; Murata *et al.*, 2005), funcionalmente análoga à PTEN. Isto permitiu, pela primeira vez, perceber como a variação na polarização da membrana leva à activação de cascatas de sinalização a jusante (Murata *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Interessantemente, as vias de sinalização activadas por sinais eléctricos parecem ser as mesmas que as que intervêm na quimiotaxia (McCaig *et al.*, 2005), mas parecem funcionar de forma independente, com a componente eléctrica a sobrepor-se aos demais sinais de taxa de células para o fecho da ferida (Zhao, 2009).

1.3 A bioelectricidade durante o processo regenerativo

Tal como referido acima, o EF passivo ao funcionar como organizador espacial poderá ser o primeiro factor necessário à regeneração (Altizer *et al.*, 2002). Além disso, este organizador parece criar o segundo factor necessário, o WE/AEC, por atrair células epiteliais das regiões adjacentes à ferida (raio de alcance em princípio igual à volta da ferida) (Zhao *et al.*, 2009). Os fibroblastos são elementos importantes na regene-

ração uma vez que contribuem para a formação do blastema e para a informação posicional do mesmo (Endo *et al.*, 2004), sendo também reconhecida a galvanotaxia catódica de fibroblastos (Nuccitelli e Erickson, 1983). Esta migração epitelial e dérmica garante, segundo o modelo da descontinuidade posicional (Carlson, 1974; Meinhardt, 1983; Campbell e Crews, 2008), informação posicional e a formação do blastema (Campbell e Crews, 2008), constituindo assim o terceiro factor necessário. Este conceito bioeléctrico está também na base da hipótese de nos sistemas não regenerantes mais evoluídos, como os mamíferos, a formação de cicatriz inibir a continuação de fluxos iónicos necessários à regeneração (Altizer *et al.*, 2002). No entanto, recentemente, Tseng *et al.* (2010) induziram regeneração após cicatrização, mas num período refractário da regeneração pré-metamórfica de *Xenopus*, onde a pele apresenta características diferentes da do adulto. Tal como o WE/AEC, o blastema é necessário, mas não suficiente para a regeneração, tendo sido proposto um modelo de dois passos por Endo *et al.* (2004). Este modelo engloba a necessidade de fibroblastos de diferentes partes do membro e de enervação para a criação de um blastema ectópico com capacidade de gerar um novo membro. Como já referido os sinais bioeléctricos influenciam a migração epitelial e dérmica, mas também de células nervosas (Borgens *et al.*, 1981). Na fase de crescimento regenerativo pouco se sabe sobre os eventos bioeléctricos na padronização, sendo apenas extrapolado os efeitos na morfogénese, principalmente em relação ao crescimento neuronal, aquando da modulação funcional nas primeiras fases da regeneração (Adams *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2010).

1.4 Bioelectricidade e comportamento celular

Aspectos chave em todos os processos de desenvolvimento e de regeneração são a integração, coordenação e regulação dos vários tipos de comportamento celular: proliferação (número), migração (posição) e diferenciação (tipo). Assim, se for demonstrado um controlo destes comportamentos por fenómenos bioeléctricos existe grande possibilidade de esta estar associada, directa ou indirectamente, a tal processo (Sundelacruz *et al.*, 2009). De facto, existem evidências para a migração e posterior proliferação, mas pouco se sabe sobre o seu efeito na desdiferenciação, processo essencial em muitos organismos regenerantes, incluindo no peixe-zebra. Adicionalmente à componente passiva, o epitélio que cobre a ferida providencia uma componente bioeléctrica activa através da sobre-regulação de translocadores iónicos (ou seus reguladores) que cria fluxos iónicos específicos sobre o blastema em formação ou maturação e, possivelmente também na fase de crescimento regenerativo (Reid *et al.*, 2009). Ambos os processos podem resultar em desdiferenciação induzida por despolarização, bem como indução galvanotáctica da enervação, para criar células de tipo mesenquimatoso com alto potencial proliferativo (Adams *et al.*, 2007; Levin, 2007). No primeiro caso, existe uma correlação funcional entre V_m e o potencial proliferativo e o estado de diferenciação (dois comportamentos intimamente ligados), evidenciado por células proliferativas embrionárias e tumores terem elevada despolarização enquanto células quiescentes diferenciadas serem fortemente polarizadas. Por exemplo, a despolarização de células de fígado regenerantes confere-lhes maior capacidade proliferativa que células hiperpolarizadas de órgãos menos regenerantes, como os neurónios (Binggeli e Weinstein, 1986; Levin, 2007; 2009). Apesar de não existirem ainda evidências directas de desdiferenciação *via* despolarização ou *via* outro evento bioeléctrico, alguns estudos têm mostrado uma possível relação, que parece passar pela activação de cascatas genéticas (Adams *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2010). A dependência dos nervos na regeneração está associada à manutenção (e não formação) do blastema (Akimento *et al.*, 2003; Stoick-Cooper *et al.*, 2007b; Kumar *et al.*, 2007; Brockes e Kumar, 2008).

1.5 Transdução do sinal bioeléctrico em genético

Embora se saiba que a manipulação de fenómenos biofísicos tem um efeito na regeneração, não se sabe ainda quais os mecanismos de transdução deste sinal nas cascatas genéticas associadas ao processo. Qualquer interveniente no processo bioeléctrico é passível de veicular informação. Entre estes encontram-se: (i) a mobilização e assimetria de mensageiros secundários, tais como fosfolípidos inositóis, nucleótidos cíclicos (*e.g.*, cAMP) e cálcio (Ca^{2+}); (ii) a modulação da actividade de outros translocadores sensíveis a voltagem, quer sejam de iões (*e.g.*, K^+ , Na^+ (Tseng *et al.*, 2010)) ou de outras substâncias (*e.g.*, serotonina); (iii) a redistribuição dos receptores de membrana pelo EF (*e.g.*, neurotransmissor acetilcolina e factor de crescimento Egf); (iv) electroforese e electro-osmose de proteínas membranares (Huang e Cormie *et al.*, 2008) e electroforese de proteínas e morfogénios através do citoplasma e/ou junções de hiato (Oviedo *et al.*,

2010); (v) a activação de sinais via β -integrinas por alterações conformacionais nas proteínas membranares (Huang e Cormie *et al.*, 2008); (vi) a actividade de translocadores da membrana nuclear (Matzke *et al.*, 2010); e (vii) a transdução directa via activação, por despolarização membranar, do factor de transcrição NRF-2 (McCaig *et al.*, 2005; 2009; Levin *et al.*, 2007; 2009). Além disto, extracelularmente o campo eléctrico pode gerar gradientes de concentração de moléculas sinalizadoras (McCaig *et al.*, 2005).

1.6 Síntese das evidências fisiológicas da bioelectricidade na regeneração

Três tipos de evidências fisiológicas revelam que a bioelectricidade é um factor chave da regeneração: (1) evidência descritiva – fortes campos eléctricos acompanham e predizem as várias fases da regeneração, apresentando uma progressão diferente nos sistemas não regenerantes (Borgens *et al.*, 1977b; Nawata, 2001; Reid *et al.*, 2009); (2) evidência de perda-de-função – o bloqueio das correntes associadas à regeneração (*e.g.*, Jenkins *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 2009), bem como o bloqueio de constituintes da actividade bioeléctrica (fluxo de H^+ (Adams *et al.*, 2007) e Na^+ (Tseng *et al.*, 2010)) e da própria como um todo por enxertos de pele madura (Mescher, 1976; Altizer *et al.*, 2002), impedem a regeneração (a reversão da polaridade eléctrica leva a efeitos opostos na regeneração – degeneração (Borgens *et al.*, 1977a; Reid *et al.*, 2005)); (3) evidência de aumento- e ganho-de-função – o aumento da actividade bioeléctrica nos seus diversos factores conduz ao aumento da taxa de regeneração em sistemas regenerantes (Reid *et al.*, 2005) e a activação da regeneração em sistemas pouco ou não regenerantes (Becker, 1972; Borgens *et al.*, 1977a; Sissen e Fowler, 1981).

1.7 Hipótese biofísica da regeneração

Com todo o enquadramento acima mencionado, torna-se plausível implicar os mecanismos bioeléctricos na formação e manutenção do blastema. A hipótese biofísica da regeneração defende que tais mecanismos são epigenéticos e não epifenómenos ao processo regenerativo (Levin, 2007; 2009). Entre os estudos que suportam tal hipótese encontra-se a descoberta da importância do efluxo de H^+ mediado pela bomba V-ATPase na regeneração de *Xenopus* pré-metamórficos (Adams *et al.*, 2007). Esta bomba é sobre-regulada por factores desconhecidos no WE/AEC 6 hpa, sendo necessária à progressão da regeneração, mas não afectando o fecho da ferida. Este fluxo foi demonstrado ser necessário à proliferação celular na regeneração e parece conter informação morfogénica. Importaneamente, verificou-se a suficiência do fluxo de H^+ na estimulação da regeneração no período refractário (Adams *et al.*, 2007). Resultados não publicados do laboratório de acolhimento deste estudo apontam também para a necessidade desta bomba na taxa regenerativa (Joana Monteiro, comunicação pessoal). Recentemente, mostrou-se em *Xenopus* a necessidade (Reid *et al.*, 2009; Tseng *et al.*, 2010) e até suficiência (Tseng *et al.*, 2010) de um influxo de Na^+ no período de formação do blastema.

Assim, este estudo teve como objectivo principal compreender melhor a natureza iónica das correntes eléctricas associadas à regeneração. Utilizando a barbatana caudal de peixe-zebra como modelo emergente de regeneração (Poss *et al.*, 2003; Akimenko *et al.*, 2003; Stoick-Cooper *et al.*, 2007b), pretendeu-se contribuir para a construção do perfil de dinâmica iónica durante a regeneração com recurso a técnicas biofísicas e moleculares. Numa análise biofísica determinou-se um mapa espaço-temporal da dinâmica dos iões Cl^- e Na^+ e da densidade de corrente eléctrica. Numa análise molecular explorou-se a expressão de um putativo canal de Cl^- e modulou-se farmacologicamente este canal e um putativo canal de Na^+ .

Os resultados obtidos revelam a importância dos iões cloreto e sódio na regeneração de estruturas complexas e contribuem para a sustentação da hipótese biofísica da regeneração.

Materiais e Métodos | 2

2.1 Linhas de peixe-zebra e cirurgia

Peixes-zebra de tipo selvagem de genótipo AB com mais de 6 meses de idade foram usados em todas as análises deste estudo. Os peixes foram mantidos na Unidade de Peixes-Zebra do IGC (Instituto Gulbenkian de Ciência) com recirculação de água a pH 7, temperatura de 28 °C, condutividade de 600-800 μ S e fotoperíodo de 14 h luz (dia) e 10 h escuridão (noite). Os peixes foram anestesiados em metanosulfonato de tricaína (Sigma-Aldrich) 0,6 mM excepto nos ensaios de despistagem do efeito deste anestésico, onde se usou 0,1 mM do relaxante muscular sulfonamida de N-benzil-p-tolueno (BTS, Sigma-Aldrich). Após a anestesia, as barbatanas caudais foram amputadas com lâminas de bisturi. Três tipos de cortes foram efectuados de acordo com o desenho experimental (Fig. 5): (1) distal, \approx 2 segmentos ósseos antes da bifurcação radial (D1), para elucidar os perfis de dinâmica iónica de Cl^- e Na^+ e de densidade de corrente; (2) distal, \approx 2 segmentos após a bifurcação radial (D2), para testar a hipótese da bioelectricidade veicular informação morfogénica durante o processo regenerativo; e (3) proximal, 3-5 segmentos após o pedúnculo (P), para evidenciar um possível gradiente bioeléctrico proximo-distal e investigar a hipótese da bioelectricidade como factor mitogénico. Os cortes D2 e P foram efectuados na parte ventral ou dorsal da barbatana e na outra metade foi feito um corte D1, originando uma barbatana com dupla amputação em forma de degrau. Isto permitiu comparar intra-espécimen a possível diferença gerada pelos dois tipos de corte, mas permitiu sobretudo diluir a variabilidade individual, que se revelou relativamente grande em todos os ensaios efectuados. Os animais regeneraram em aquários fora do sistema central de forma a manter uma temperatura de 30 °C, que possibilita uma regeneração mais rápida do que a 28 °C, durante aproximadamente duas semanas. Embora os peixes regenerem sempre que amputados, evitou-se cortar os mesmos peixes mais de 3-4 vezes. A experiência foi conduzida de acordo com as normas éticas aprovadas para o efeito.

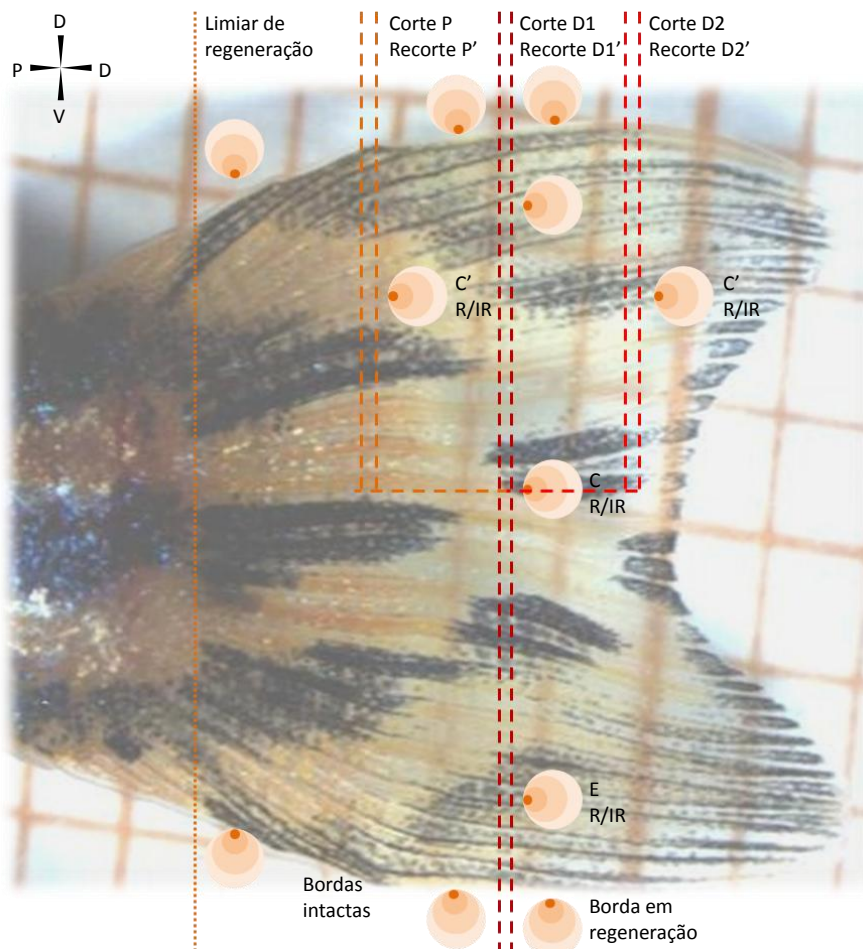


Fig. 5 Desenho experimental dos ensaios efectuados neste estudo

Três tipos de amputações foram feitas: (1) D1 – corte distal base; (2) D2 – corte distal; (3) P – corte proximal. Estes dois últimos cortes foram feitos em degrau com o corte basal D1. O recorte para recolha de tecidos para hibridação *in situ* foi efectuado 1-2 segmentos antes do nível de amputação. C – centro da barbatana; C' – centro de 50% da barbatana; E – extremidade da barbatana; R – raio; IR – inter-raio. ● – fluxos iónicos, gradiente colorido indica a direcção das medições. Canto superior direito: eixos da barbatana caudal, P/D – proximo-distal; D/V – dorso-ventral. Fotografia da barbatana, cortesia de Joana Monteiro.

2.2 Técnica de microsonda vibrátil específica de ião, SIET (do inglês Scanning Ion-selective Electrode Technique)

2.2.1 Fundamento da técnica

A técnica de microsonda vibrátil específica de ião, SIET (Applicable Electronics) foi introduzida em estudos biológicos por Jaffe e Levy (1987) e Kuhnreiter e Jaffe (1990). A SIET mede, de forma não invasiva, fluxos extracelulares estáveis e de baixa magnitude (na ordem de μV) de iões específicos (neste caso, Cl^- e Na^+) perpendiculares à superfície de tecido, com um suficiente rácio sinal-ruído. Este rácio é uma medida dos gradientes iónicos específicos comparados com a concentração total de fundo (do meio), que deve ser baixa para o ião a medir de forma a se atingir um sinal-ruído suficientemente bom. Microellectrodos selectivos de ião detectam potenciais de voltagem de corrente contínua ao longo da superfície em regeneração que são proporcionais à concentração do ião particular, sendo depois convertidos em fluxos ($\text{pmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$) pela equação de Nernst e pela primeira lei de Fick (Shipley e Feijó, 1999; Smith *et al.*, 1999). Especificamente, a sonda (microellectrodo) vibra entre dois pontos separados por uma distância predefinida para cada tipo de ião (tendo em conta principalmente o seu tamanho e subsequente taxa de difusão) – 70 μm para Cl^- e 50 μm para Na^+ – com o ponto de origem a uma distância do tecido de um diâmetro da ponta do microellectrodo ($\approx 7 \mu\text{m}$), a fim de estar no microambiente do gradiente gerado (Fig. 8D). A resolução espacial é também determinada pelo diâmetro da ponta, $\approx 7 \mu\text{m}$. O circuito é fechado por um ellectrodo de referência de KCl afastado do microambiente da regeneração para evitar possíveis interferências devido a difusão iónica, nomeadamente para Cl^- . Um ensaio de despistagem onde se mediu o fluxo de Cl^- no próprio ellectrodo de referência revelou a forte estabilidade deste ellectrodo (valor de referência do meio semelhante ao valor medido perto do ellectrodo, Fig. 6) e excluiu assim a necessidade de usar pontes salinas na medição dos fluxos de Cl^- . O ellectrodo de referência foi mantido, após as medições, numa solução de KCl 3 M.

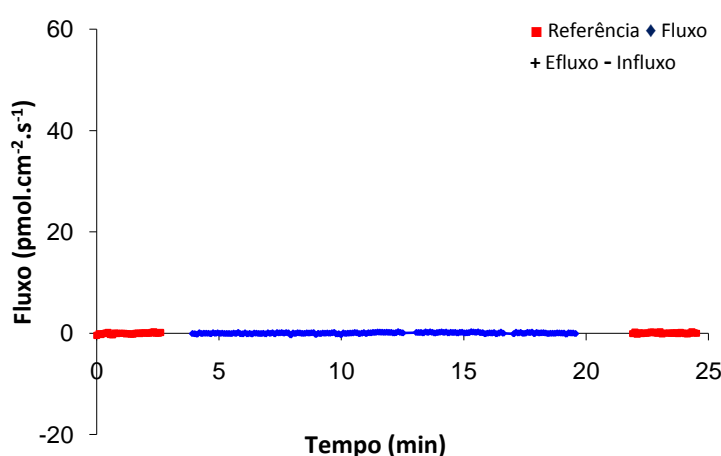


Fig. 6 Ensaio de despistagem para quantificar a possível difusão de Cl^- do ellectrodo de referência Valores de fluxo de Cl^- perto (referência, vermelho) e longe (fluxo, azul) do ellectrodo de referência.

2.2.2 Construção do microellectrodo

Os dois microellectrodos selectivos de Cl^- e Na^+ foram construídos de forma semelhante, na seguinte ordem: (1) microellectrodos de $\approx 7 \mu\text{m}$ de diâmetro da ponta para ambos os iões foram feitos a partir de capilares de vidro com diâmetro de 1,5 mm (TW150-4; World Precision Instruments) por um puxador de ellectrodos (P-97 Flaming/Brown; Sutter Instrument), utilizando um programa de um passo optimizado para cada nova caixa de capilares, de acordo com as instruções do equipamento. Uma vez que para este diâmetro o rendimento não era elevado nem constante, todos os pares de capilares gerados foram monitorizados à lupa com uma grátícula na ocular para garantir um diâmetro aproximado de 7 μm ; (2) os microellectrodos foram então silanizados com N,N-dimetiltrimetilsililamina de silano (Sigma-Fluka). Resumidamente, foram dispostos na vertical com as pontas para cima, numa rede colocada numa placa de Petri e tapada com um gobelé de 1 l. Os microellectrodos foram colocados a 200-220 $^{\circ}\text{C}$ (durante a noite ou 2-3 h), injectando-se de seguida $\pm 80 \mu\text{l}$ de silano em todas as direcções, para vaporização uniforme deste. Desligou-se a estufa

20-30 min após a injeção, deixando-se depois arrefecer até à temperatura ambiente; (3) os microelctrodos de Cl^-/Na^+ foram enchidos pela base com 1-2 cm de electrólito (solução condutora de iões: KCl 100 mM/NaCl 100 mM). O electrólito foi pressionado até à ponta para evitar a formação de bolhas de ar e introduziu-se pela ponta e por capilaridade uma coluna de $\pm 25 \mu\text{m}$ de ionóforo (permutador de iões líquido (LIX, do inglês *Liquid Ion Exchanger*) específico de Cl^-/Na^+ (Chloride Ionophore I-Cocktail A, Sigma-Fluka/Sodium Ionophore II-Cocktail A, Sigma-Fluka); (4) um eléctrodo de suporte de cloreto de prata ($\text{AgCl}(\text{Ag}^+)$) foi então electrevestido numa solução de KCl 3 M, para equilibrar as cargas no fio, evitando interferências na taxa de difusão iónica. Para terminar a construção do microelctrodo, este eléctrodo de suporte foi inserido no capilar para existir contacto eléctrico com o electrólito (Fig. 8D).

Antes de cada utilização, o microelctrodo foi calibrado com concentrações crescentes de Cl^-/Na^+ (0,1, 1, e 10 mM de KCl/NaCl). O declive de Nernst óptimo era de $56-58 \pm 11 \text{ mV/década}$, negativo para Cl^- e positivo para Na^+ . Apenas microelctrodos neste intervalo foram usados. Por fim, para cada ião foi medida a dinâmica de uma fonte artificial para testar o sistema quanto à direcção dos fluxos detectados e quanto ao rácio sinal-ruído (concentração do ião a medir no meio possibilita ou não uma boa leitura dos fluxos). Além disso, dado o enorme gradiente gerado entre a fonte artificial e o meio, tal dinâmica permite também calcular o limite de difusão e determinar assim o microambiente afectado (nunca ultrapassou 1 mm, Fig. 7). Para Cl^-/Na^+ a fonte artificial foi KCl 1 M/NaCl 1 M feita num capilar com 1% (p/v) de agarose. O meio usado foi mimético do ambiente natural dulçaquícola do peixe-zebra que é hipotónico em relação ao animal. O dispositivo experimental foi igual ao usado nas medições dos peixes, mas em vez do espécimen colocou-se a fonte artificial (Secção 2.2.3 e Fig. 8A e B). Este meio tinha sido previamente optimizado para H^+ (Joana Monteiro) e por apresentar baixa concentração de Cl^- e Na^+ , foi usado nas medições de ambos os iões. O meio é constituído por (mM): NaCl 0,4; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; K_2HPO_4 0,08; KH_2PO_4 0,005; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2; MOPS 0,3; pH 6,8. A este meio adicionou-se a anestesia tricáína a uma concentração final de 0,375 mM, abaixo da usada na amputação (0,6 mM), de forma a aumentar a duração do ensaio e diminuir a taxa de morte durante as medições (quanto mais tempo em anestesia maior o risco de morte) e acertou-se de novo o pH uma vez que a tricáína acidifica o meio. As fontes artificiais deram um padrão característico descendente com a distância à fonte e com ruído praticamente inexistente, revelando boas condições para a utilização deste meio nas medições ao longo da regeneração (Fig. 7).

Nos ensaios de despistagem da anestesia usou-se BTS 0,1 mM. O meio apenas se alterou na concentração de NaCl de 0,4 para 1 e 10 mM, para se despistar o efeito da quantidade de Na^+ e respectivo gradiente na polaridade positiva ou negativa do fluxo deste ião.

Ambos os eléctrodos duravam em média cerca de um dia (até cerca de 15 medições), mas por vezes podiam chegar mesmo a uma semana (com verificação e calibração diárias). Nos Anexos I, II e III encontram-se os protocolos de optimização dos microelctrodos para Cl^- e Na^+ e a influência da tricáína, respectivamente.

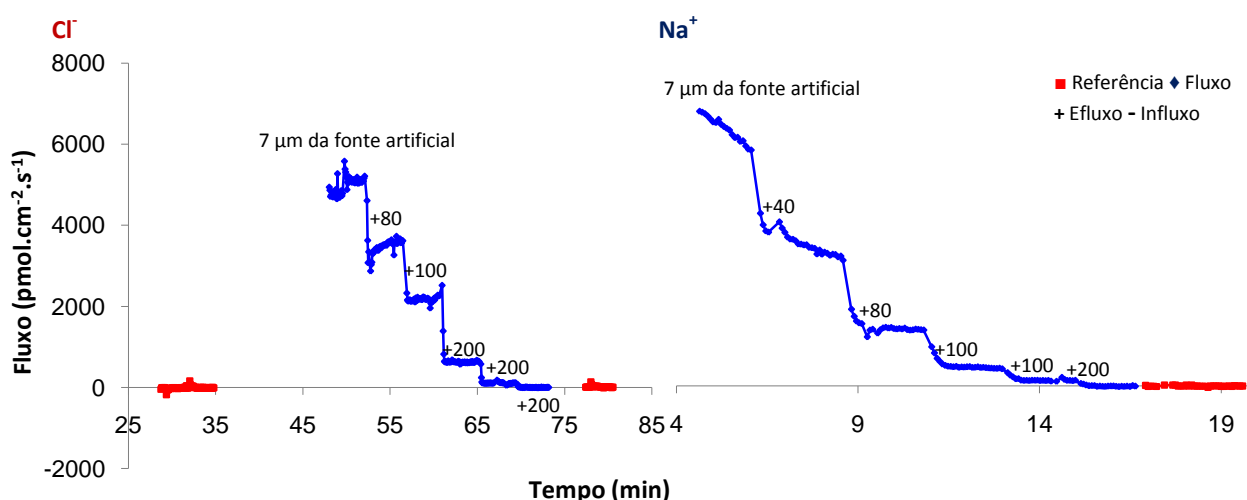


Fig. 7 Fontes artificiais de Cl^- e Na^+ Microelctrodos de $\approx 7 \mu\text{m}$ de diâmetro de ponta e $\pm 25 \mu\text{m}$ de coluna do respectivo ionóforo. Os números representados marcam a distância à fonte artificial. Ambas as fontes artificiais deram um padrão característico descendente em degrau com a distância à fonte e ambas apresentaram baixo ruído.

2.2.3 Dispositivo experimental

Após a amputação os peixes recuperaram em água do sistema e, consoante os períodos temporais a medir, foram transferidos para aquários de regeneração ou novamente anestesiados com tricáína 0,6 mM (quando 10 mpa) para se proceder às medições dos fluxos iónicos. Evitando contaminações os peixes foram rapidamente transferidos para um dispositivo experimental criado para o efeito (Fig. 8). Mediram-se então os fluxos iónicos, começando por tirar o valor de referência afastado do microambiente da regeneração (geralmente >1 cm, mas chegava >1 mm, por informação da fonte artificial e outros estudos). Após estabilização a cerca de $0 \text{ pmol.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (2-5 min) mediram-se, consoante o desenho experimental a seguir, os fluxos no centro, na extremidade, por cima ou nas bordas da barbatana. Para os dois primeiros desenhos seguiu-se a rotina de medir 2 raios e 2 inter-raios contíguos (rastreo manual linear, 2-5 min/posição, Fig. 8D); os dois últimos foram resultados preliminares (2-5 min/posição). Em medições consecutivas $\pm 50\%$ do meio usado foi substituído por novo para diluir possíveis interferências na composição do meio devido à respiração e osmoregulação do peixe. Isto tornou-se mais pertinente devido ao longo tempo de cada medição, à volta de 30 min em média.

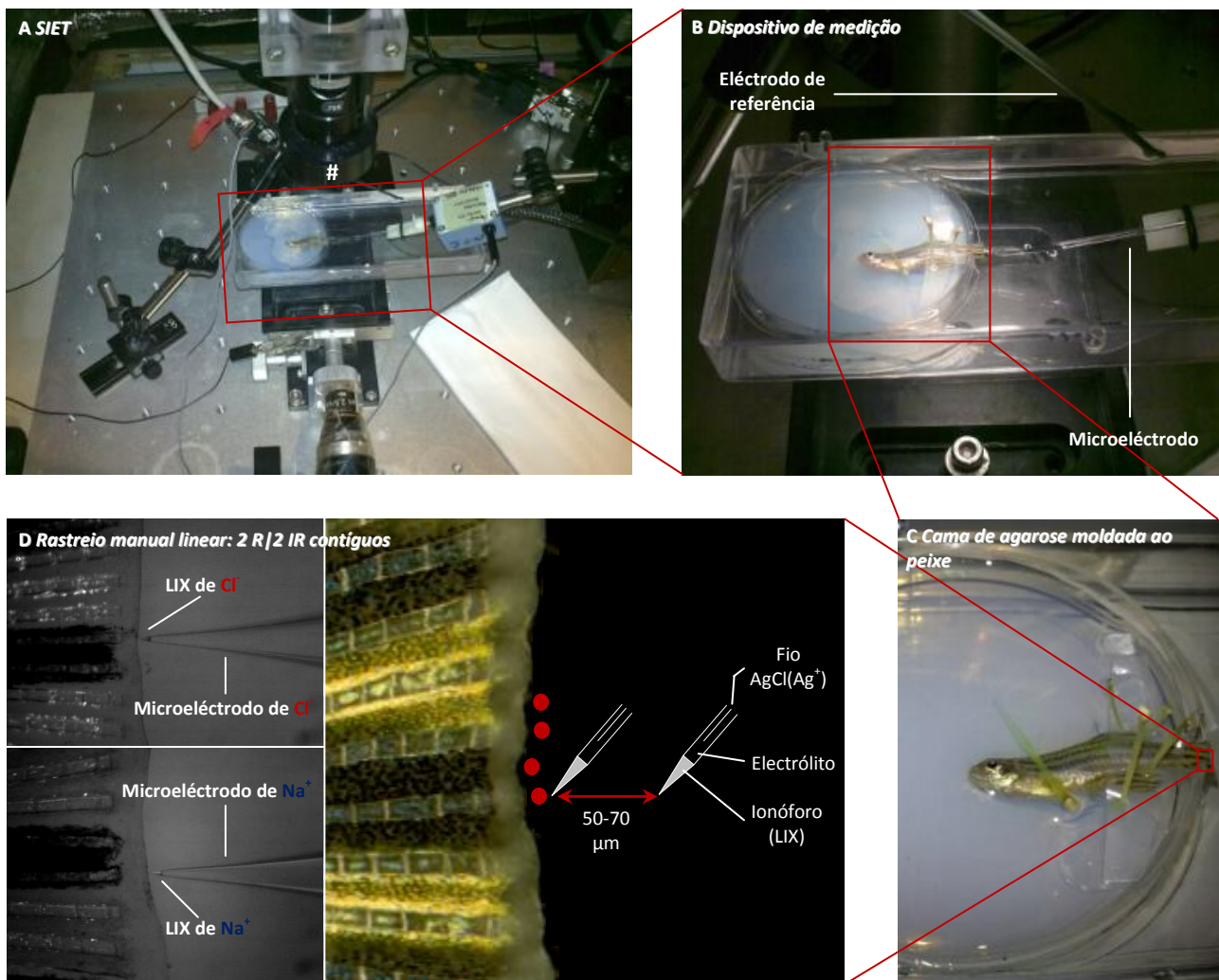


Fig. 8 Dispositivo de medição dos fluxos de Cl^- e Na^+ O peixe, depois de anestesiado, foi imobilizado numa cama (placa de Petri de 55 mm) de agarose a 2% (p/v; mesma composição do meio) moldada ao seu corpo, o pedúnculo da barbatana caudal foi coberto com parafilme e fixado com a ajuda de espinhos de cacto de modo a evitar movimentos (C). Esta cama foi depois transferida para outra caixa maior cheia de meio (B) para medir os fluxos iónicos pela técnica SIET (A). Aqui, sob um estereoscópio (#) e antes das medições, o microeléctrodo foi enquadrado com a barbatana caudal e afastou-se o eléctrodo de referência da mesma (A e B). O rastreo manual linear consistiu em medir dois raios e dois inter-raios contíguos (4 pontos vermelhos em D) 2-5 min/posição, com uma distância de vibração rotinada para cada ião: $70 \mu\text{m}$ para Cl^- e $50 \mu\text{m}$ para Na^+ (D). Imagens a preto e branco em D adquiridas pelo ASET, através do estereoscópio (#), durante uma medição de fluxos de Cl^- (em cima) e Na^+ (em baixo) num raio ao centro da barbatana. Peixes 48 hpa.

2.2.4 Períodos temporais

Em concordância com as quatro fases estabelecidas na Secção 1.1 e Fig. 2, os períodos temporais primários deste estudo foram os pontos de transição entre essas fases: 12 hpa, 24 hpa e 48 hpa; a estes adicionou-se ainda 0 hpa, *i.e.*, antes da amputação como controlo e 336 hpa (2 semanas), quando a regeneração está terminada. Foram depois adicionados períodos temporais secundários que foram períodos de ligação dos anteriores de forma a refinar o perfil. Estes foram 10 e 30 mpa, 1, 3 e 6 hpa, 18 hpa, 36 hpa, 72 hpa e 96 hpa. Existiu uma preocupação em focar a primeira fase da regeneração, essencialmente por três razões: (1) explorar a hipótese dos fenómenos bioeléctricos como possível iniciador da regeneração; (2) corresponder à fase de formação do WE e do AEC; e (3) discriminar a fase de corrente passiva da activa.

2.2.5 Aquisição e tratamento de dados

O processo de aquisição de dados dos fluxos iónicos foi controlado e monitorizado usando como interface o software ASET (*Automated Scanning Electrode Techniques*, Applicable Electronics), onde as rotinas de calibração e amostragem foram predefinidas. As concentrações das soluções de calibração dos iões foram inseridos no ASET para este calcular o declive de Nernst (Secção 2.2.2) e para a amostragem definiu-se a distância de vibração para Cl^- e Na^+ de, respectivamente, 70 e 50 μm com ponto de origem perto do tecido (Fig. 8D), de maneira a respeitar a convenção de efluxo corresponder a valores positivos e influxo a valores negativos. Após a recolha, os dados foram exportados para uma folha de cálculo (Excel, Microsoft Office) pré-configurada, transformados em fluxos e representados graficamente.

2.2.6 Análise estatística

A unidade de regeneração e, consequentemente, a unidade bioestatística deste estudo, foi o raio por regenerar individualmente e de forma independente dos outros raios (Nabrit, 1929; Secção 1.1). Assim, n refere-se ao raio, excepto quando se apresenta o inter-raio ou rácio R/IR como unidade.

Os dados quantitativos foram analisados com os programas Excel e GraphPad Prism 5. Os *outliers* foram analisados pelo pré-teste de Grubs e quando presentes foram retirados dos dados tendo em conta a significância biológica. Como os dados não tinham uma distribuição normal (negativo no pré-teste de Shapiro-Wilks), compararam-se as medianas com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn (comparação de pares). Os valores são expressos na forma de média \pm erro padrão e os resultados foram considerados significativamente diferentes para um valor de $P < 0,05$.

2.3 Técnica de microsonda vibrátil de voltagem, SVET (do inglês Scanning Vibrating Electrode Technique)

2.3.1 Fundamento da técnica

A técnica de microsonda vibrátil de voltagem, SVET (Applicable Electronics) foi introduzida em estudos biológicos por Jaffe e Nuccitelli (1974) e Borgens *et al.* (1977b). A SVET mede densidades de corrente total estáveis e de baixa magnitude (na ordem de nA), de forma não invasiva, em superfícies perpendiculares aos tecidos. O rácio sinal-ruído é suficientemente alto nos microeléctrodos de platina para detectar e medir pequenas densidades de corrente geradas. Uma vez que o microeléctrodo (após capacitado e calibrado, Secção 2.3.2) vibra (em x e y – 2D) através de uma haste piezoeléctrica comandada por um oscilador de onda sinusoidal, o sinal da sonda aquando da presença de um campo eléctrico de origem natural ou artificial (microeléctrodo de calibração) é também uma onda sinusoidal. Esta onda tem a mesma frequência que o sinal de vibração e uma amplitude proporcional ao gradiente de voltagem através do elemento resistivo (meio). Assim o microeléctrodo detecta um sinal de corrente alternada gerada pelo movimento de um condutor (microeléctrodo) num gradiente de voltagem de corrente contínua. As frequências de vibração típicas vão de 100-1000 Hz (nas medições efectuadas usou-se cerca de 240 Hz) (Shiple e Feijó, 1999; Reid *et al.*, 2007). Aquando da presença de um campo eléctrico, o microeléctrodo mede uma diferença de potencial nos dois pontos da vibração e o sinal de corrente alternada gerado passa por dois amplificadores

de frequência bloqueados para cada sinal da vibração de x e y, filtrando todos os sinais (nomeadamente o ruído) deixando passar apenas os sinais com a fase e frequência da vibração. Os sinais são por fim processados pelo software que converte os valores de potencial em densidades de corrente pela lei de Ohm após a calibração prévia do sistema. Tal como na SIET, a resolução espacial é determinada pelo diâmetro da ponta, rondando 10-30 μm neste caso. O circuito é fechado por dois eléctrodos auxiliares de platina (Fig. 9A), um como referência também electroplatinizado (tal como o microeléctrodo (Secção 2.3.2) ou com uma pilha de 9 V, com este ligado ao pólo negativo e outro de referência ao positivo), e outro que serve de terra.

2.3.2 Preparação dos microeléctrodos

O microeléctrodo de platina (fio de metal isolado e afiado, Fig. 9) foi preparado nos seguintes passos: (1) electroplatinização da ponta da sonda vibratória com solução de platinização: acetato de chumbo a 1% (v/v) e cloreto de platina ($\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 10% (v/v) em água destilada. Esta electrodeposição de platina preta até o diâmetro da ponta esférica formada atingir 10-30 μm , de maneira a ser pelo menos 1/3 do tamanho da fonte (Fig. 9B), permite à ponta ter uma alta capacitância em resultado da grande área de superfície final; (2) teste da capacitância (ganho/voltagem) da sonda no osciloscópio para verificar se estava entre os valores recomendados: 1-2 nF ou mais; (3) definição da frequência e amplitude de vibração de cada nova sonda. A frequência mantém-se nos valores definidos por defeito e definiu-se a amplitude como o tamanho da ponta esférica de maneira a ver-se uma dupla imagem em vibração 1D; (4) calibração da sonda no meio de medição com a aplicação por um microeléctrodo tipo da SIET, mas sem ionóforo, de uma densidade de corrente de +60 nA ($\approx 21,2 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$) no eixo do xx e yy. Esta corrente eléctrica origina correntes iónicas que são detectadas pelo microeléctrodo em vibração e a partir da distância que se predefiniu (150 μm), o software calcula a corrente que está a sair do eléctrodo de calibração (segundo a equação $J = I / 4\pi r^2$) (Shipley e Feijó, 1999; Reid *et al.*, 2007). O meio usado foi o mesmo que em SIET.

Estes microeléctrodos, ao contrário dos de SIET, são extremamente duradouros, mas quando se substituiu um, repetiu-se todos estes passos.

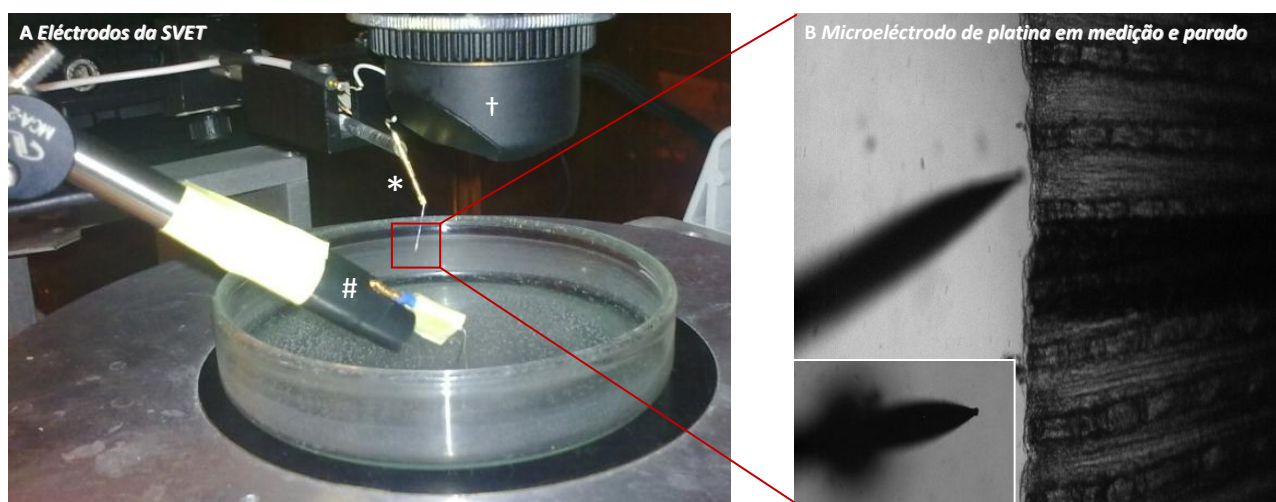


Fig. 9 Eléctrodos usados na SVET A Microeléctrodo de platina (*) electroplatinizado e eléctrodos auxiliares de platina (#): eléctrodo de referência (também electroplatinizado) e eléctrodo terra (não electroplatinizado). B Medição da corrente total num peixe 10 mpa num inter-raio ao centro da barbatana. Microeléctrodo de platina em vibração 2D e parado (canto inferior direito) onde se nota a ponta esférica de platina preta. Imagens a preto e branco adquiridas pelo ASET, através do microscópio (+).

2.3.3 Dispositivo experimental

A anestesia e imobilização dos peixes seguiram os mesmos passos que na SIET. Como o dispositivo da SVET estava montado num microscópio invertido, teve de se inverter a cama de agarose sob um suporte de vidro e moldou-se um canal de drenagem na cama para a respiração do peixe. Depois de enquadrar a son-

da vibratória com a barbatana, mediram-se as densidades de corrente, começando novamente pela referência e depois até $\approx 50 \mu\text{m}$ do tecido. Gravaram-se depois os valores da densidade de corrente total, consoante o desenho experimental a seguir. Em medições consecutivas $\pm 50\%$ do meio usado foi substituído por novo (como na SIET) e a duração das medições foi de cerca de 15 min.

2.3.4 Períodos temporais

Por razões de optimização de tempo, uma vez que a técnica só se tornou disponível quase no final do período deste estudo, analisaram-se apenas alguns períodos temporais que representassem uma amostragem do processo de regeneração e que se ajustassem à questão a responder (Fig. 14): 0 hpa, 10 mpa, 1, 6, 24, 48, 72 e 336 hpa.

2.3.5 Aquisição e tratamento de dados

Tal como na SIET o interface para aquisição de dados das densidades de corrente foi o ASET, onde as rotinas de calibração e amostragem estavam predefinidas. Por convenção correntes de saída são valores positivos e correntes de entrada são valores negativos. O sistema grava em 2D, *i.e.*, em x e y, calculando depois o valor da corrente total como a soma dos vectores. Após a recolha, os dados foram exportados para uma folha de cálculo (Excel, Microsoft Office) e representados em gráficos apenas com a dimensão x. Por se terem realizado poucas medições, os resultados são muito preliminares e foram apresentados de maneira quantitativa (média \pm erro padrão) e qualitativa (percentagem de influxos), sem análise estatística (devido à não optimização final da técnica).

2.4 Hibridação *in situ*

A hibridação *in situ in toto* foi efectuada de acordo com o protocolo optimizado no laboratório (Anexo IV). O fundamento desta técnica baseia-se na utilização de sondas marcadas (digoxigenina), que após ligação específica ao mRNA complementar permitem a detecção do padrão de expressão de um determinado gene. Utiliza-se um anticorpo específico para a digoxigenina acoplado à fosfatase alcalina que produz uma reacção com revelação cromogénica (precipitado insolúvel de cor púrpura), capaz de resolução celular.

O putativo canal analisado neste estudo – canal de cloreto activado por aumento de volume (ICl_n) – surgiu da análise anterior de um transcrito produzido no laboratório. Foi usada uma sonda de 400 pb de comprimento cujo protocolo estava já em optimização. Caudas amputadas foram deixadas regenerar durante vários períodos temporais e cortadas em 4 partes com 3-5 raios cada, após recorte de 1-2 segmentos atrás do plano de amputação para distinguir o tecido regenerado do inicial (Fig. 5). Os quatro pedaços foram fixados de um dia para o outro em paraformaldeído (PFA) a 4% e depois desidratados numa série de metanol/PBT a 25, 50, 75 e 2x 100% e mantidos a -20°C . Isto permite a estabilização das RNAs e previne a degradação dos transcritos. Após reidratação as barbatanas foram permeabilizadas com $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de proteinase K até 15 min e pré-hibridizadas em tampão de hibridação (com formamida para inactivar as fosfatases alcalinas endógenas) a $68-70^\circ\text{C}$ durante 3 h. O tampão de hibridação foi trocado pela sonda (400-700 ng RNA/ml de tampão de hibridação) e deixado a hibridar de um dia para o outro a $68-70^\circ\text{C}$. Depois de bloqueados, para prevenir ligações inespecíficas do anticorpo, os pedaços de barbatana foram incubados a 4°C de um dia para o outro com anticorpo anti-digoxigenina-AP (Roche) diluído 1:2000 na solução de bloqueio. Por fim adicionou-se o substrato de revelação BM-purple (Roche) parando-se a reacção com PBT assim que a marcação fosse claramente visível. Em todos os ensaios usou-se a sonda *antisense* (teste) e a sonda *sense* (controlo). A imagiologia foi feita numa lupa acoplada a uma câmara digital. Os pedaços de barbatana foram mantidos a 4°C numa solução de PBT/azida a 1%. Esta solução protege de contaminação por fungos. Para ter um perfil do padrão de expressão usaram-se barbatanas nos períodos temporais primários: 0, 24, 48 hpa e o secundário 72 hpa.

2.5 Modulação farmacológica com aciclovir e tricaína

2.5.1 Desenho experimental da inibição de ICl_n com aciclovir

Como os peixes têm forte regulação homeostática *via* brânquias (Evans, 2008), não se pode pôr fármacos na água, sem se saber se o efeito vai ser local (na barbatana em regeneração) ou sistémico. Por isso, no caso da inibição de ICl_n criou-se um sistema experimental para separar a solução da barbatana caudal das brânquias (Fig. 10).

O desenho experimental consistiu em 4 peixes, 2 de controlo com cerca de 200 μ l de solução Danieus 1x (mM: NaCl 58; KCl 0,7; $MgSO_4$ 0,4; $Ca(NO_3)_2$ 0,6; HEPES 0,5; pH 7,6) e 2 de tratamento com cerca de 200 μ l de aciclovir 1 mM (Sigma), ambos numa bolsa de parafilme. Apesar da optimização do sistema e do uso de BTS sub-relaxante (0,05 mM), apenas se obteve 1 controlo primário (animal imóvel com solução Danieus 1x) e 1 tratamento, sendo que 1 peixe serviu de controlo secundário, por ficar livre no aquário (o último peixe foi excluído da análise por ferimentos na imobilização). A janela do ensaio foi entre 4 e 9 hpa de maneira a incluir o período das 6 hpa, que pareceu ser um período importante (Secção 4.1.6).

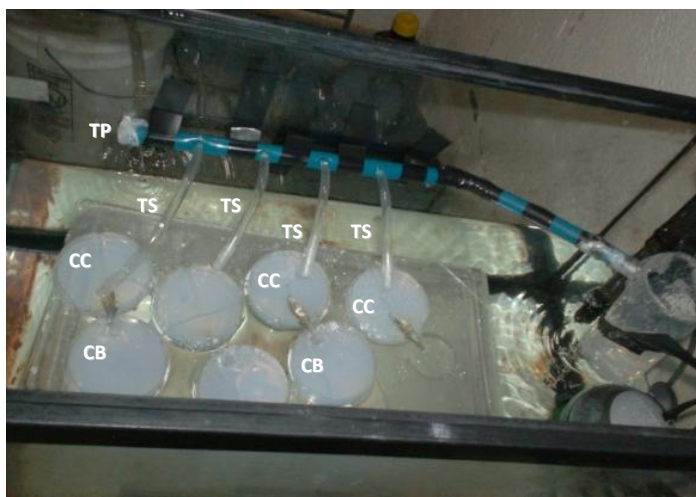


Fig. 10 Sistema experimental criado para a inibição farmacológica de canais de cloreto sensíveis ao volume (ICl_n) com aciclovir Para evitar o contacto entre a água do sistema e o fármaco, conceberam-se duas camadas (placas de Petri de 55 mm) de agarose $\approx 2\%$ (p/v) adaptadas e moldadas ao corpo (CC) ou à barbatana (CB). Em ambas o fármaco ou o controlo foi mantido numa bolsa de parafilme impermeável. O fluxo foi controlado por um conjunto de tubos secundários (TS) ligado a um primário (TP) onde recirculava a água. Os tubos finos foram ainda envolvidos em parafilme com um pequeno orifício para gotejar, para evitar vazamentos para a barbatana em tratamento.

2.5.2 Desenho experimental da inibição de Na_v com tricaína

A abordagem na modulação farmacológica de canais de sódio sensíveis a voltagem (Na_v) foi muito diferente da inibição de ICl_n por se conhecer o método usado por Tseng *et al.* (2010) em *Xenopus*. Assim, esta consistiu em duas fases: (1) determinação do limiar de não anestesia da tricaína, *i.e.*, a concentração abaixo da qual os peixes não apresentavam qualquer um dos 3 sinais típicos de anestesia (Iwama *et al.*, 1989): (i) perda de equilíbrio; (ii) perda dos movimentos brutos do corpo, mas continuação dos operculares; (iii) fim dos movimentos operculares. E guiou-se pela premissa de que caso não haja perda de mobilidade, qualquer fenótipo na regeneração será específico e não sistémico. As concentrações usadas foram (mM): 0 (controlo), 0,6 (usada para anestesia), 0,375 (usada neste estudo no meio de medições, Secção 2.2.2), 0,250, 0,150 (estas duas usadas por Tseng *et al.* (2010)), 0,06, 0,03 e 0,015 (n mínimo =4). A concentração limiar foi 0,06 mM, 10x menos que a usada para a anestesia e que corresponde à mesma proporção usada em Tseng *et al.* (2010); e (2) o desenho experimental propriamente dito (Fig. 11).

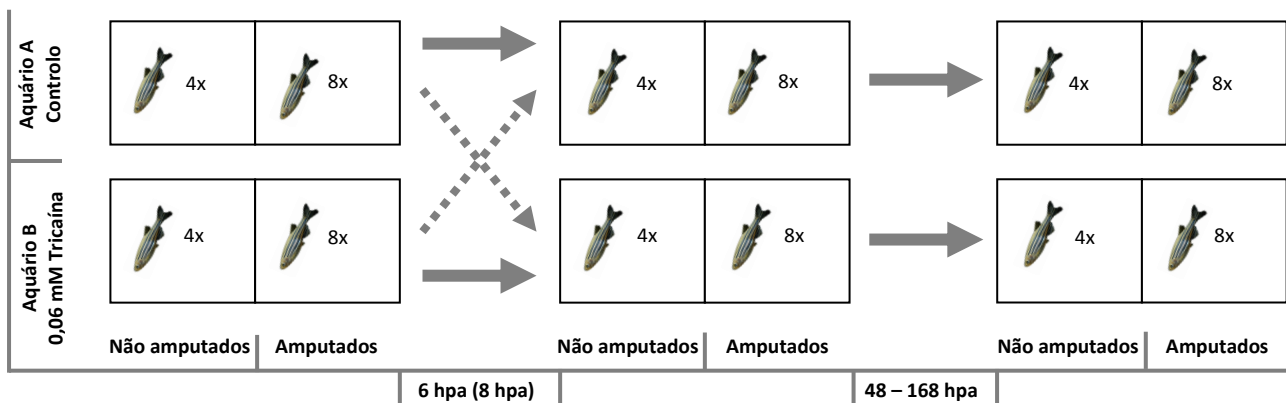


Fig. 11 Ensaio farmacológico dos canais de sódio sensíveis a voltagem (Na_v) O ensaio consistiu em 24 peixes distribuídos por 4 compartimentos, 2 de controlo (**Aquário A**) e 2 com tricaína 0,06 mM (**Aquário B**). Metade dos compartimentos tinha peixes amputados e a outra metade tinha peixes não amputados até às 8 hpa, altura em que se deu a permuta de peixes amputados para os aquários com peixes não amputados, dada a facilidade de distinção. Permuta às 8 hpa para incluir o período das 6 hpa. Às 48, 72, 96 e 168 hpa (1 semana) os peixes amputados foram todos fotografados e antes e no fim (168 hpa) do ensaio os peixes não amputados foram fotografados. Esta última parte do desenho experimental era para provar que o crescimento basal não fosse afectado pela tricaína e assim reforçar a premissa de que qualquer fenótipo na regeneração era específico e não o sub-produto de algo sistémico. Como as fotografias às 0 hpa não saíram muito correctamente, não se conseguiu efectuar este passo. Nos dois aquários a temperatura e condutividade foram controladas diariamente aquando da troca de 1 l dos 5 l de meio de cada aquário sem ou com tricaína por meio fresco, de modo a diluir a degradação natural e a fotodegradação da tricaína.

2.5.3 Taxa regenerativa

Para perceber o efeito das modulações farmacológicas anteriores na taxa regenerativa, mediu-se o comprimento do regenerado nos peixes de controlo e tratamento amputados. O comprimento do regenerado foi medido em 6 raios contíguos 2-a-2: raios 2 e 3; 9 e 10; e 16 e 17. Isto para incluir as duas extremidades, de maior crescimento (lobular) e o centro, de menor crescimento; e para não medir os raios exteriores do eixo dorso-ventral (1 e 18), que geralmente apresentam mais danos naturais. As medições foram feitas com o programa ImageJ e as médias dos raios foram calculadas e representadas graficamente numa folha de cálculo. A análise estatística das médias foi conduzida no GraphPad Prism 5, usando o teste *t* paramétrico.

Com o intuito de obter dados abrangentes e integrativos para explicar a regeneração da barbatana caudal, recorreu-se a dois tipos de análise: descritiva e funcional. Na primeira procurou-se revelar o início e progressão da regeneração do ponto de vista da dinâmica iónica e densidade de corrente total e, de uma forma mais incipiente, revelar a expressão génica de um putativo canal de cloreto; e na segunda análise, por ensaios de perda-de-actividade, procurou-se estabelecer associações/correlações e relações de causa/efeito entre os fenómenos descritos e algumas fases críticas da regeneração.

3.1 Análise descritiva

3.1.1 Perfil global da dinâmica iónica de cloreto e sódio e da densidade de corrente

Ao longo da regeneração o perfil da dinâmica iónica, *i.e.*, o padrão de fluxos extracelulares de Cl^- e Na^+ no raio (Fig. 12A e B) foi semelhante, como se demonstra na Fig. 12C. A “linha de tendência” (ligação curvilínea das médias) adaptada ao fluxo de Cl^- foi sinusoidal com três picos sequenciais aos 10 mpa e às 6 e 24-48 hpa e duas depressões às 3 e 12-18 hpa – quatro pontos de inflexão (Fig. 12C). Para Na^+ , a “linha de tendência” foi bastante similar, mas um pouco deslocada para a esquerda. Apresentou também três picos sequenciais aos 10 mpa e às 12 e 36 hpa e duas depressões às 3 e 18-24 hpa – quatro pontos de inflexão.

Sendo dois dos putativos principais componentes do fenómeno bioeléctrico (McCaig *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2009; Özkucur *et al.*, 2010), a “soma” de Cl^- e Na^+ origina, grosseiramente, a corrente total. Assim, verificaram-se diferenças significativas 10 mpa, aquando do potencial de ferida, e 6 hpa aquando da presumível reversão da corrente (Reid *et al.*, 2009; Fig. 12C). Embora preliminares, os resultados da densidade de corrente parecem suportar estes eventos bioeléctricos ao se juntar os resultados quantitativos (médias) e qualitativos (percentagem de influxos) 10 mpa e 6 hpa (Fig. 14A1). Observou-se maiores erros padrões até cerca da 1 hpa para ambos os iões (Fig. 12A1 e B1) que pode estar correlacionado com a parte bioeléctrica passiva no início da regeneração.

3.1.2 Perfil específico da dinâmica de cloreto e de sódio e da densidade de corrente no raio/inter-raio

Ao contrário do perfil global, o perfil específico da dinâmica iónica pretendeu comparar o padrão existente entre o raio (R) e inter-raio (IR) ao longo da regeneração (Fig. 12A2, B2 e D). Procedeu-se a esta análise por três razões: (1) ainda é controverso na literatura a formação ou não de blastemas no inter-raio – blastemas de tecidos leves (Murciano *et al.*, 2001; 2002; Mari-Beffa e Murciano, 2010); (2) o IR não tem fibras nervosas; e (3) para discriminar que tipo de dipolo se forma para a homeostasia eléctrica (Secção seguinte e 4.2). A análise raciométrica de R/IR contíguos (Secção 2.2.3, Fig. 12D) mostrou o padrão de R vs IR de uma maneira mais directa e robusta que a comparação das médias (Fig. 12A2 e B2). O padrão obtido mostra em geral maiores efluxos no raio que no inter-raio ($R > IR$, rácio > 1) até às 24 hpa (exclusive, mas ainda com alguns espécimens com o padrão $R > IR$) e depois deste período $R = R$. 10 mpa (fase bioeléctrica passiva) apresenta grande diferença (rácio $\gg 1$) e depois, aquando do provável início da fase bioeléctrica activa 1-3 hpa (Secção 4.1.3), existe um aumento pautado até atingir o máximo 6 hpa, decrescendo depois suavemente até se desvanecer 24 hpa ($R = IR$, rácio ≈ 1). Este perfil é muito similar para ambos os iões e, curiosamente, com o perfil só do raio (Fig. 12C). O perfil de Cl^- apresenta um fenómeno original onde $R < IR$, que ocorre apenas imediatamente após a amputação – 10 mpa, havendo um caso à 1 hpa (# na Fig. 12A2 e D). Ambos apresentam rácio < 1 . Em geral, os erros padrões também foram maiores no raio que inter-raio, podendo apontar para uma maior actividade bioeléctrica no raio (Fig. 12A2 e B2).

Embora com dados muito preliminares, a densidade de corrente parece corroborar este padrão de $R > IR$, principalmente 6 hpa e 48 hpa (Fig. 14A2).

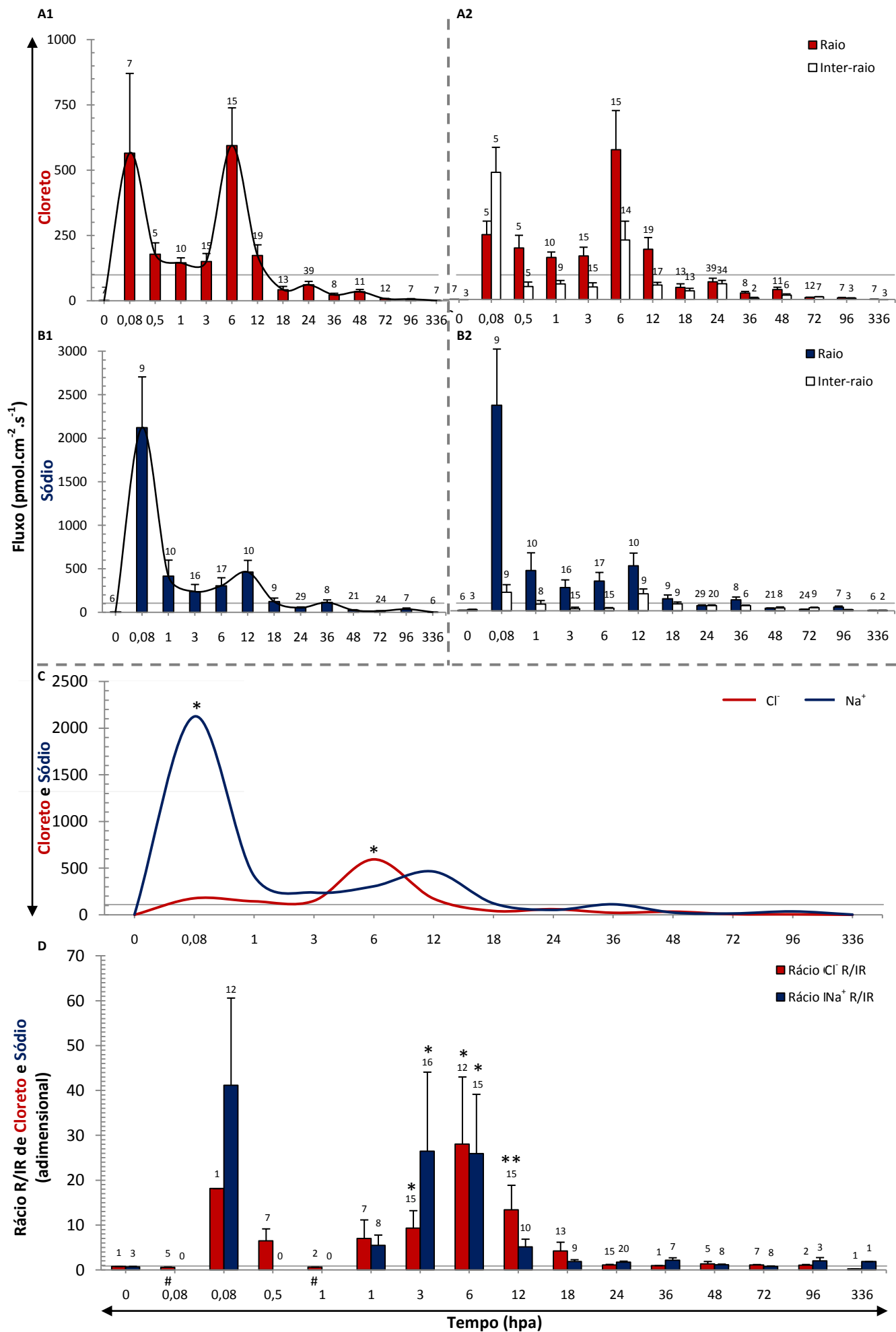


Fig. 12 Perfil de fluxos extracelulares de Cl^- e Na^+ ao longo da regeneração da barbatana A1/B1 Perfil de fluxos de cloreto/sódio no raio revela três picos e duas depressões associados às diferentes fases da regeneração. **A2/B2** Padrão entre o raio e o inter-raio que se dissipa a partir das 24 hpa, inclusive. No perfil de cloreto verificou-se a reversão de um padrão de fluxo do raio menor que o do inter-raio ($R < IR$) aos 10 mpa – 1 hpa (períodos assinalados com # em **D**) para um em que $R > IR$, que se manteve até às 24 hpa e continuamente no caso do perfil de sódio. **C** Integração do perfil de cloreto e sódio, com diferenças significativas nos pontos-chave do potencial de ferida e reversão da corrente total. **D** Perfil do rácio raio/inter-raio de cloreto e sódio ao longo da regeneração. Esta análise comprovou a tendência observada em **A2/B2** com rácios próximos de 1 – linha de grelha horizontal – a partir das 24 hpa, inclusive e muito maiores que 1 à volta das 6 hpa, com uma tendência de descida suave à direita e esquerda. Aqui ficou patente o caso particular de $R < IR$ aos 10 mpa e 1 hpa (períodos com #) no fluxo de cloreto, com o rácio a ser $\approx \frac{1}{2}$ da unidade, respectivamente 0,59 e 0,64 (abaixo da linha). Linha de grelha horizontal representa um fluxo de $100 \text{ pmol.cm}^{-1}.\text{s}^{-1}$ quando presente, excepto em **D** que representa 1 unidade adimensional. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; n = números acima das barras de erro padrão e representam raios, inter-raios ou número de cálculos de rácio.

3.1.3 Perfil específico de fluxos de cloreto e sódio e da densidade de corrente no centro/extremidade e proximal/distal

O interesse destes perfis deve-se à morfologia simétrica da cauda e ao facto de amputações proximais e distais demorarem aproximadamente o mesmo tempo a regenerar (Spallanzani, 1769; Morgan, 1906). Pretendeu-se assim estabelecer uma possível causalidade directa entre taxa de crescimento e intensidade de fluxos iónicos/corrente total. Na Secção anterior a relação R/IR ficou bem estabelecida, mas a relação entre centro (C) e extremidade (E) e proximal (P) e distal (D) tem muito poucas réplicas na densidade iónica e na densidade de corrente, apresentando-se apenas dados preliminares. Estudou-se também a presença ou não de um dipolo C/E tal como acontece na cauda de urodelos (Nawata, 2001).

O perfil para Cl^- (Na^+ não foi analisado) pareceu indicar diferenças para C/E a partir das 48 hpa (Fig. 13A) onde $C < E$, que se dissipam a partir das 96 hpa (resultados preliminares não mostrados), correlacionando-se com o início da dissociação do blastema e retorno à actividade mitótica basal. Os resultados da densidade de corrente mostraram grande variabilidade no controlo negativo estabelecido à partida, 6 hpa (por não haver diferenças nos fluxos preliminares de Cl^- e por nesta altura não existir proliferação (Poleo *et al.*, 2001)), apresentando contudo uma pequena diferença de $C < E$ 48 hpa – quando já existe a proliferação máxima após a maturação do blastema (Poleo *et al.*, 2001). Estes dados suportam, com pouca robustez, o padrão $C < E$ (Fig. 14B1). Ambas as medições não parecem apontar para a existência de um dipolo C/E, principalmente às 48 hpa onde não se verifica corrente de entrada (Fig. 14B1).

Em relação ao padrão P/D, resultados preliminares apontam para um gradiente crescente do efluxo de Cl^- ($P > D$; Fig. 13B). Além de $P > D$, os fluxos também mostram o padrão $R > IR$ (Secção anterior). O ensaio preliminar da densidade de corrente deu resultados inconclusivos (Fig. 14B2), além de novamente o controlo negativo estabelecido à partida (6 hpa, por não existir proliferação) não apresentar a robustez necessária para uma correcta interpretação da globalidade do ensaio.

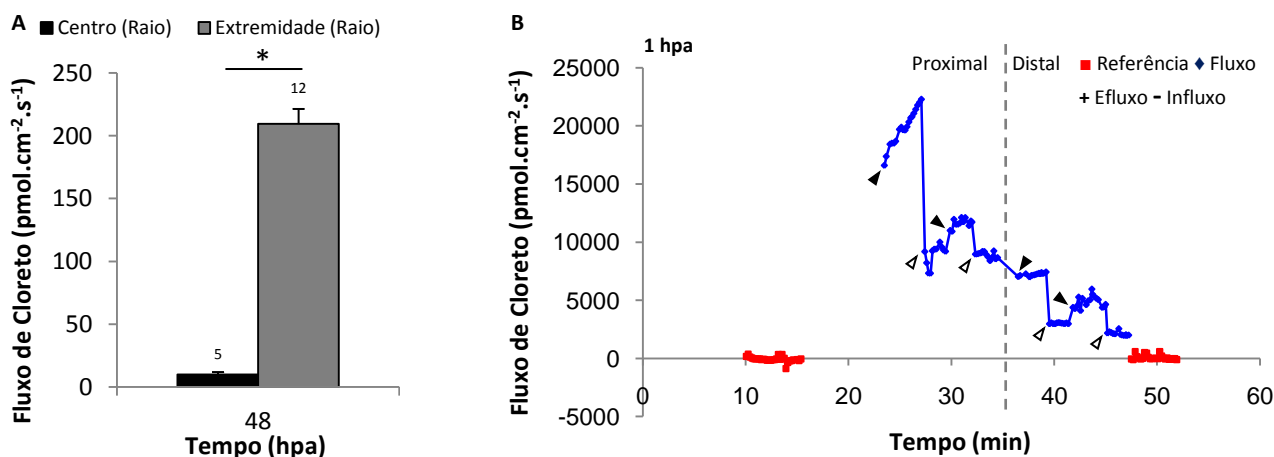


Fig. 13 Padrão de centro (C)/extremidade (E) e proximal (P)/distal (D) **A** 48 hpa existe uma diferença significativa no efluxo de cloreto entre extremidade e centro, em que $C < E$. **B** Fluxos de Cl^- 1 hpa com análise proximal e distal. Além de $P > D$, os fluxos representados 1 hpa também mostram o padrão de $R > IR$, onde as cabeças de setas pretas apontam para o início do raio e as brancas do inter-raio. * $P < 0,05$; n = números acima das barras de erro padrão e representam raios.

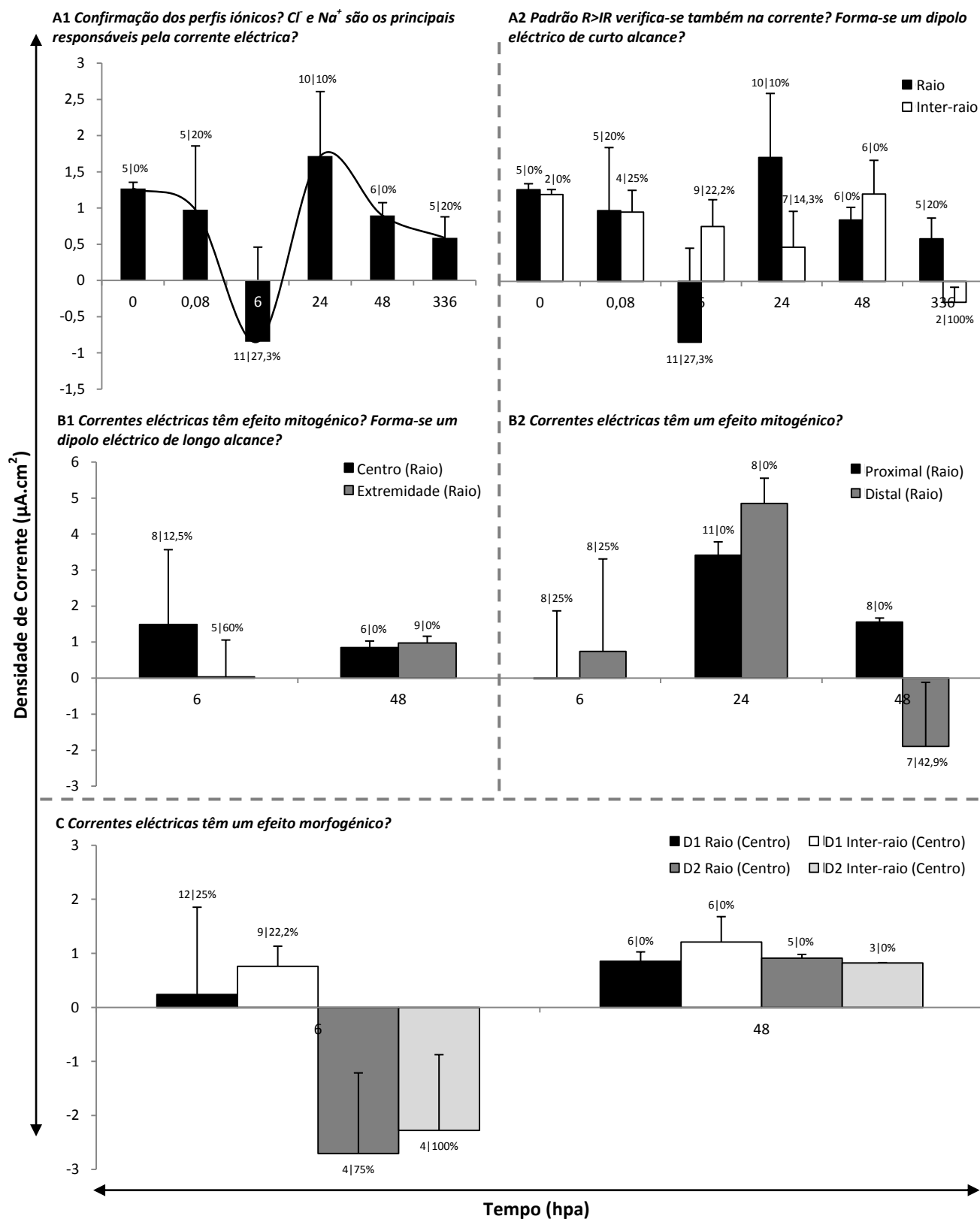


Fig. 14 *Questões emergentes da análise dos perfis de Cl^- e Na^+ e que podem ser mais rapidamente respondidas pela medição das densidades de corrente ao longo da regeneração da barbatana* **A1** Perfil global conciso da densidade de corrente ao longo da regeneração; **A2** perfil específico da densidade de corrente no raio e inter-raio. **B1** Padrão da densidade de corrente no centro e extremidade, num período sem proliferação (6 hpa, controlo negativo estabelecido à partida) e noutro de grande proliferação (48 hpa, tratamento); **B2** padrão da densidade de corrente proximal e distal às 6 hpa (controlo negativo estabelecido à partida) e 24 e 48 hpa (tratamento). **C** Padrão da densidade de corrente no raio e inter-raio antes e depois da bifurcação (cortes D1 e D2, respectivamente), num período com e sem presumível diferença entre raio e inter-raio (baseado nos perfis de Cl^- e Na^+), 6 hpa (tratamento) e 48 hpa (controlo negativo estabelecido à partida), respectivamente. Os períodos temporais foram otimizados em relação à questão a responder mediante a informação dos perfis de Cl^- e Na^+ . Números acima das barras de erro padrão: *n* raios e inter-raios | percentagem de corrente de entrada.

3.1.4 Ensaios de despistagem da tricaína e da concentração de sódio

Devido à recente publicação de Tseng *et al.* (2010) onde se usou tricaína (150 ou 250 μM) para inibir a entrada de Na^+ *via* Na_v e se mostrou que tal modulação inibia a regeneração, conduziram-se alguns ensaios de despistagem. Conhecendo-se *a priori* o estudo de Reid *et al.* (2009), que mesmo usando uma concentração de 1 mM de tricaína (para anestesiá-los girinos de *Xenopus*) obteve correntes de entrada de baixa densidade que foram associadas ao influxo de Na^+ a partir 6 hpa, efectuaram-se dois ensaios: (1) medir a dinâmica de Na^+ na ausência de tricaína (com BTS) nos períodos expectáveis de influxo – 24 e 48 hpa (Fig. 16B; dada a semelhança temporal entre a regeneração de *Xenopus* e peixe-zebra, Fig. 15); e (2) aumentar a concentração de Na^+ no meio para 1 (Fig. 16C) e 10 mM (Fig. 16D) em diferentes ensaios e medir também a 24 e 48 hpa, uma vez que Reid *et al.* (2009) usou uma concentração de 10 mM de NaCl contra 0,4 mM no meio dos peixes e a diferença no gradiente poderá levar à não detecção de uma corrente de entrada. Em ambos os ensaios manteve-se o efluxo de Na^+ e no segundo ensaio devido à grande concentração de Na^+ no meio, o rácio sinal-ruído do sistema baixou bastante. Embora o número de réplicas não seja suficiente para uma análise estatística robusta, a tendência foi sempre de efluxo (Fig. 16B, C e D), conferindo (alguma) robustez às condições base usadas (Fig. 16A). Não foram obtidos resultados de corrente.

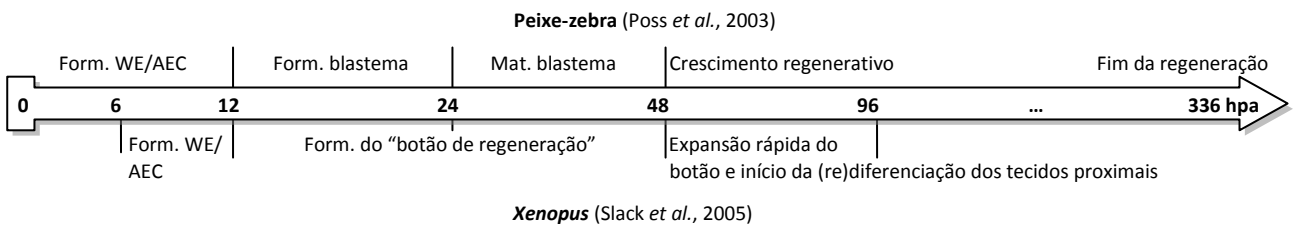


Fig. 15 Equivalência temporal das diferentes fases de regeneração entre peixe-zebra e *Xenopus* *Xenopus* é o modelo animal mais usado nas comparações temporais e fenomenológicas neste estudo. WE/AEC – epitélio de ferida/capa epitelial apical; Form. – formação; Mat. – maturação.

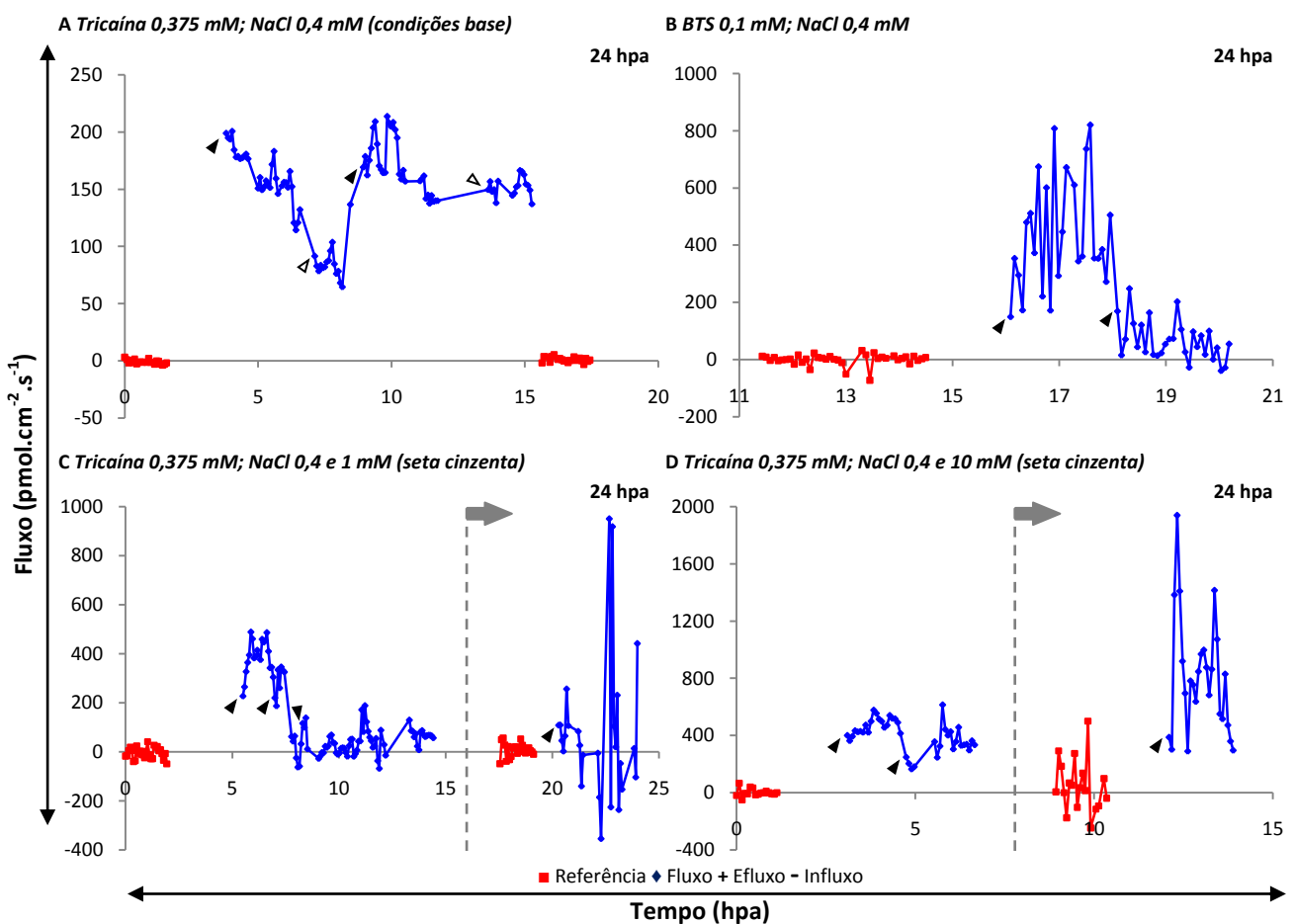


Fig. 16 Ensaios de despistagem da tricaína e da concentração de Na^+ **A** Figura tipo de fluxos de Na^+ 24 hpa num meio base com tricaína 0,375 mM e NaCl 0,4 mM. Efluxos detectados em todos os pontos de medições. **B** Fluxos de Na^+ 24 hpa num meio sem tricaína, substituída por BTS 0,1 mM e com NaCl 0,4 mM. Maior parte do ensaio com efluxo constante. **C** Fluxos de Na^+ 24 hpa num meio com tricaína 0,375 mM e inicialmente com uma concentração de NaCl 0,4 mM que a meio do ensaio (seta cinzenta) se aumentou para cerca de 1 mM. **D** Igual a C, mas aumento de NaCl para 10 mM. Em **C** e **D** verifica-se efluxo (ou uma tendência para este, **C** após aumento concentração de NaCl) antes e depois da alteração na concentração de NaCl. No entanto, o rácio sinal-ruído baixou consideravelmente com o aumento de tal concentração. Cabeças de setas pretas – início do raio; cabeças de setas brancas – início do inter-raio. **B**: $n=1$; **C**: $n=2$; **D**: $n=2$. Estas réplicas representam fluxos com a mesma tendência medidos em ensaios independentes 48 hpa.

3.1.5 Análise da expressão génica de ICl_n

Como mencionado (Secção 2.4), seleccionou-se o canal ICl_n como candidato para veicular a dinâmica iónica de Cl^- , que está envolvido no efluxo de Cl^- para regulação do volume celular. A análise das hibridações *in situ* revelou um perfil de expressão sem sinal detectável antes da amputação e até 24 hpa; 48 hpa surge uma marcação circunscrita ao blastema; e 72 hpa esta marcação mantém-se mas diminui de intensidade (Fig. 17). Este perfil de expressão ajusta-se aos dados dos fluxos de Cl^- 48 hpa, quando se obteve um pico, e 72 hpa, quando houve um decréscimo do efluxo (Fig. 12C). Contudo, não tem equivalência com o pico de efluxo 24 hpa (Fig. 12C) nem o próprio efluxo, por o WE/AEC não parecer estar marcado, indicando a necessidade de outros intervenientes.

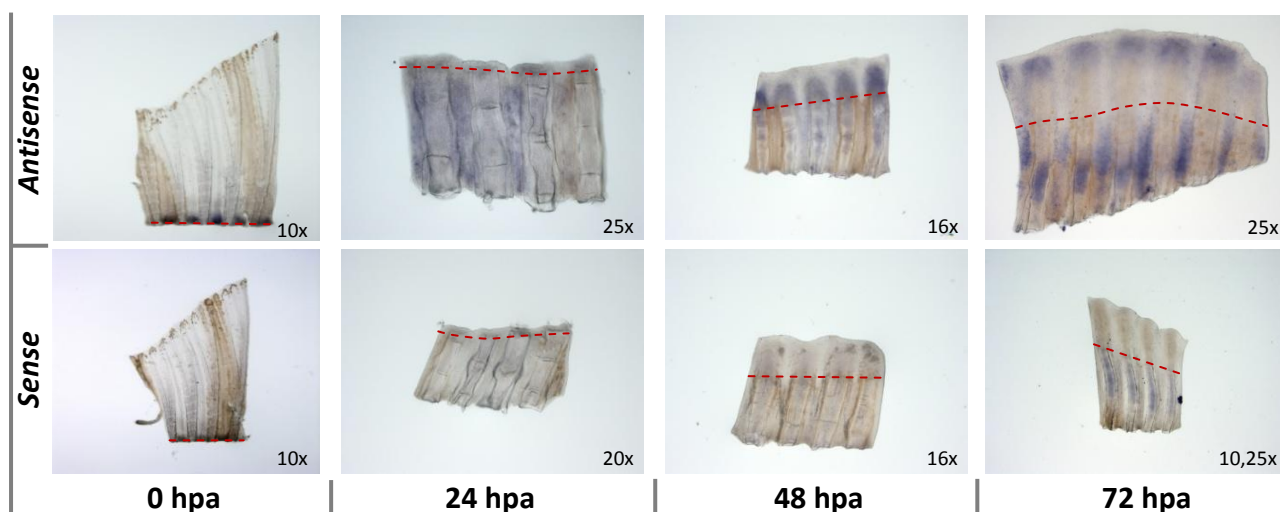


Fig. 17 Perfil preliminar da expressão génica do canal de cloreto sensível à voltagem (ICl_n) ao longo da regeneração Até às 24 hpa não se detecta expressão, 48 hpa há expressão no blastema e 72 hpa esta perde intensidade. 0 e 24 hpa: $n=1$; 48 e 72 hpa: $n=2$. Ampliação no canto inferior direito. Linha tracejado a vermelho – plano de amputação.

3.2 Análise funcional

3.2.1 Inibição farmacológica de ICl_n com aciclovir

Dadas as dificuldades técnicas de interferir directamente nas correntes eléctricas (Jenkins *et al.*, 1996), a melhor maneira de tentar modular os aspectos bioeléctricos da regeneração foi actuando nos putativos translocadores envolvidos. Assim, para analisar se os fluxos de Cl^- eram mediados directa ou indirectamente pelo canal ICl_n utilizou-se aciclovir. Este fármaco é um agente anti-viral análogo da guanosina que impede a replicação viral, mostrando-se ser também um inibidor específico destes canais, que requerem nucleósidos para a sua activação (Gschwentner *et al.*, 1995; Larkin *et al.*, 2004). A inibição 6 hpa não apresentou diferenças significativas no comprimento do regenerado contra os controlos primário às 24 e 48 hpa (Fig. 18D). O fenótipo também não pareceu afectado (Fig. 18C).

3.2.2 Inibição farmacológica de Na_v com tricaína

Apesar da importância da dinâmica de Na^+ na regeneração ser reconhecida desde o trabalho seminal de Borgens *et al.* (1977b) e mais recentemente por Reid *et al.* (2009), este ensaio funcional foi necessário devido à recente publicação de Tseng *et al.* (2010) que bloqueou Na_v com tricaína e consequentemente a regeneração. A tricaína é o anestésico mais utilizado em peixes, impedindo a formação dos potenciais de acção ao bloquear a abertura dos Na_v (Hedrick e Winmill, 2003; Tseng *et al.*, 2010). Os resultados apresentados na Fig. 18A e B demonstraram um fenótipo truncado e um atraso na taxa regenerativa, respectivamente. O efeito na taxa regenerativa foi significativo até 72 hpa enquanto o efeito no fenótipo manteve-se mesmo passando uma semana após a amputação (última gravação fotográfica). Os resultados revelam um possível efeito mitogénico (taxa) e morfogénico (fenótipo), no entanto serão necessárias mais réplicas, bem como uma análise proliferativa e morfogénica directa. Além disto, os resultados mostram a importância do influxo de Na^+ , uma vez que estes canais sensíveis à voltagem operam a favor do gradiente, promovendo a entrada facilitada de Na^+ nas células.

A parte original deste ensaio foi a troca 8 hpa, para incluir o período 6 hpa, de peixes em tratamento por peixes em controlo. Em termos de taxa regenerativa, os peixes-zebra que estiveram 6 hpa no controlo e depois passaram para tricaína 0,06 mM não apresentam diferenças significativas com os peixes-zebra sempre em controlo, mas apresentaram-nas com os peixes sempre em tricaína. Em termos de morfologia também não parece haver diferenças com o controlo. Os peixes que estiveram 6 hpa em tricaína 0,06 mM e depois no controlo não parecem afectados pelo fármaco na morfologia (embora um dos quatro peixes apresente ligeira alteração morfológica (Fig. 18A)) e na taxa regenerativa, que até aumentou de forma significativa (Fig. 18A e B).

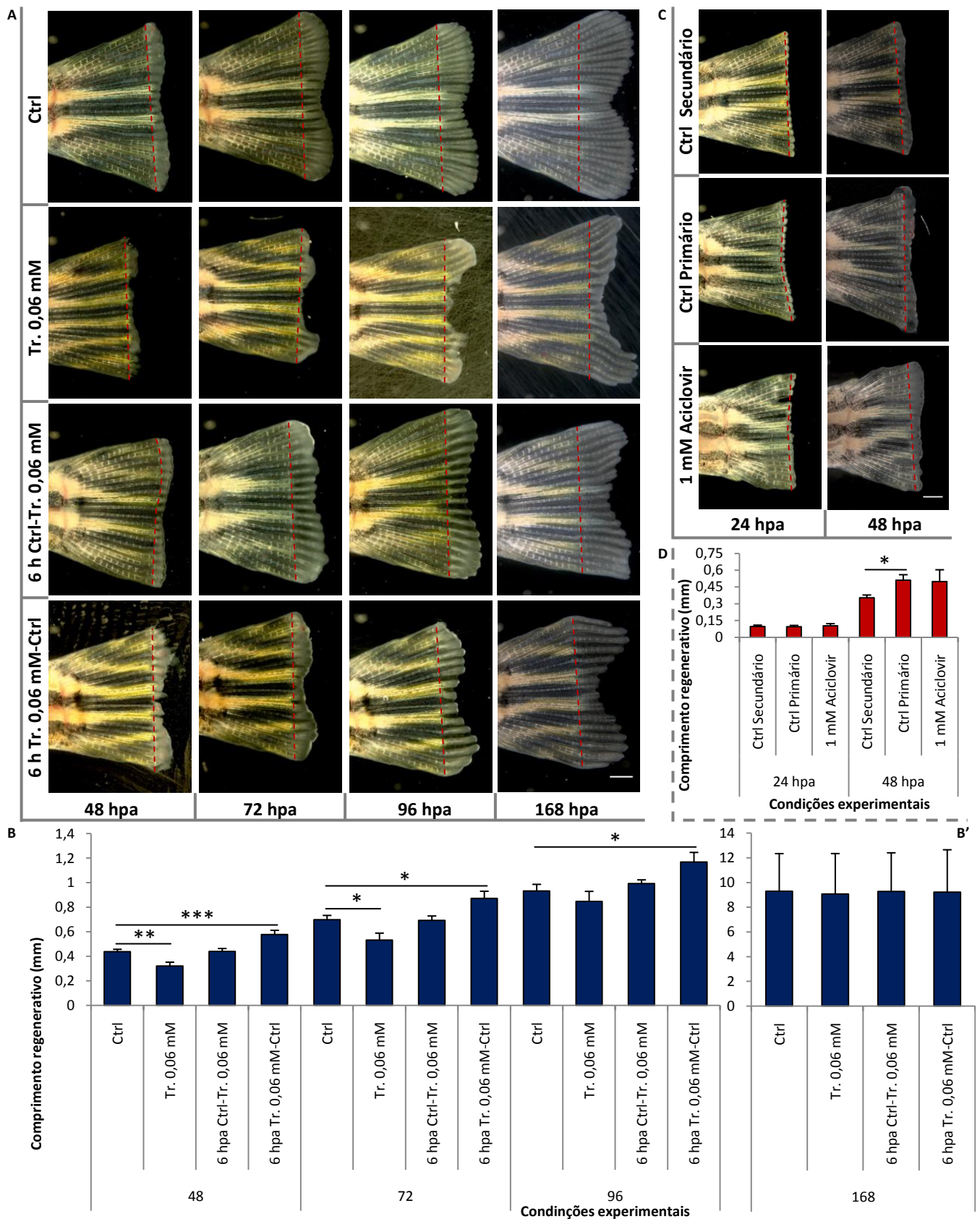


Fig. 18 Análise farmacológica preliminar dos canais de sódio sensíveis à voltagem (Na_v) e dos canais de cloreto sensíveis ao volume (ICl_n), respectivamente, por tricaína e aciclovir **A** Ensaio com tricaína. Análise fenotípica ao longo da regeneração para as diferentes condições experimentais testadas. Os peixes que estiveram em meio com tricaína ficam afectados na regeneração, principalmente os que começaram a regenerar na presença do fármaco. **B/B'** Comprimento do regenerado para as diferentes condições experimentais ao longo da regeneração. Os peixes que estiveram na presença do fármaco apresentam atraso na regeneração, mas recuperam com o tempo e 96 hpa não apresentam diferenças. **C** Ensaio com aciclovir. Análise fenotípica ao longo da regeneração sem e com este fármaco. O aciclovir pareceu não ter qualquer efeito no fenótipo. **D** Comprimento do regenerado ao longo da regeneração sem e com aciclovir. Fármaco sem efeito na taxa de regeneração. Tr. – tricaína; Ctrl – controlo. Barras de escala: 1 mm (para todas as imagens). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **A** e **B**: n mínimo = 4; **C** e **D**: $n = 1$. Linha tracejada a vermelho – plano de amputação.

Os aspectos biofísicos têm emergido e vindo a estabelecer-se na literatura como necessários e até suficientes, de forma relativamente transversal, no desenvolvimento. De destacar as áreas do desenvolvimento precoce (*e.g.*, neurulação (Shi e Borgens, 1994), assimetria esquerdo-direito (Levin *et al.*, 2002), entre outros processos (McCaig *et al.*, 2005)); do desenvolvimento dos membros (*e.g.*, Altizer *et al.*, 2002); da cicatrização (*e.g.*, Reid *et al.*, 2005; Huang e Cormie *et al.*, 2008); e da regeneração (*e.g.*, Borgens *et al.*, 1977b; Adams *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2010). De facto, dois dos principais modelos de regeneração estudados – tritões (urodelos) e *Xenopus* (anuros), parecem apresentar uma forte componente biofísica durante a regeneração dos membros (*e.g.*, Jenkins *et al.*, 1996) e da cauda (*e.g.*, Reid *et al.*, 2009), respectivamente. Se juntarmos a estes, estudos de regeneração em planárias (platelmintes, *e.g.*, Oviedo *et al.*, 2010) e anelídeos (*e.g.*, Marsh e Beams, 1950), coloca-se a hipótese dos aspectos bioeléctricos serem transversais na filogenia (e também ontogenia) animal.

Para contribuir para o estudo da hipótese biofísica da regeneração usou-se um modelo animal original nos estudos bioeléctricos em regeneração, o peixe-zebra. Este estudo permitiu concluir que a dinâmica de Cl^- e Na^+ acompanha eventos chave da regeneração (como o fecho da ferida e formação do blastema) e da bioelectricidade na regeneração (como os presumíveis potencial de ferida e reversão da corrente total) e que a dinâmica de Na^+ parece contribuir para a regeneração correcta da barbatana caudal.

4.1 Bioelectricidade e os eventos chave da regeneração

4.1.1 Conceitos de fluxo iónico passivo e activo no contexto bioeléctrico

Os conceitos de fluxo iónico passivo e activo devem ser bem discriminados, de modo a evitar “confusões” com outros conceitos homónimos mais comuns em biologia celular e biofísica e a compreender o perfil da dinâmica de Cl^- e Na^+ . Duas interpretações destes conceitos são dadas no decorrer da discussão: (1) a nível membranar/celular, a terminologia para o movimento de iões refere-se ao transporte passivo quando o fluxo de iões ocorre a favor do gradiente electroquímico e transporte activo, quando ocorre contra tal gradiente, com consumo de energia; e (2) a nível epitelial, os conceitos de passivo/activo referem-se à ausência/presença, respectivamente, de uma barreira epitelial terminalmente diferenciada ou em diferenciação, que separa o meio interno do externo. Neste caso o passivo indica também movimento a favor do gradiente electroquímico (pelas regras da teoria cinética), uma vez que nada separa o interno do externo. Assim, a passagem para a fase bioeléctrica activa coincide com a recobertura epitelial (fecho da ferida).

Apesar de após a amputação o movimento de iões ser passivo, assenta no TEP que é mantido com grande custo energético *via* bombas Na^+/K^+ -ATPases. Por esta razão, não se pode excluir a possibilidade de a evolução ter co-optado este sistema como um sensor de alerta de diminuição da *fitness* bem como o primeiro efector para a readquirir aquando de ferida/amputação.

4.1.2 Resistência diferencial durante a regeneração, que papel?

Numa análise bioeléctrica, o perfil da resistência epitelial (principal responsável pela actividade bioeléctrica) ao longo da regeneração é de grande importância essencialmente por duas razões: (1) o perfil permite explicar grandes variações na dinâmica iónica; e (2) a resistência *per se* pode bloquear a regeneração, sendo mesmo sugerida como um inibidor (indirecto) da regeneração em sistemas não regenerantes, devido à formação de uma cicatriz pouco condutiva (Altizer *et al.*, 2002). Na Fig. 19 está representado o seu perfil, baseado em dados teóricos de vários sistemas e nos dados do presente estudo. Como já referido a quebra da resistência (ou resistividade) para zero e a recobertura com muco, coágulo e depois células epiteliais formadoras do WE e do AEC criam patamares ou uma linha suave de aumento de resistividade e, consequente diminuição da condutividade. Isto explica o perfil inicial de Cl^- e Na^+ até 1-3 hpa (Fig. 12C). Como os períodos temporais de controlo (0 e também 336 hpa) não apresentam fluxos líquidos, é plausível inferir pelo perfil de resistências que a partir de 1-3 hpa tem início a fase bioeléctrica activa da regeneração (Fig. 19 e 12C e Secção seguinte).

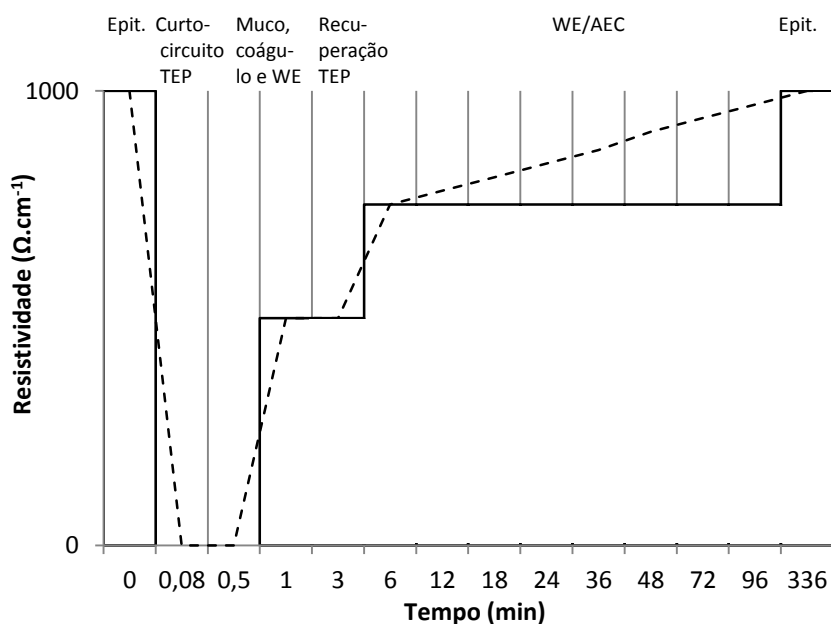


Fig. 19 Perfil expectável das resistências/resistividades em função da ausência/presença/diferenciação de estruturas epiteliais ao longo da regeneração Perfil estabelecido com base na descrição fenotípica (Poss *et al.*, 2003; Akimento *et al.*, 2003) e bioeléctrica (e.g., Borgens *et al.*, 1977; Reid *et al.*, 2009; e dados do presente estudo) da regeneração. Apenas se sabe que a resistividade em tecidos moles $\approx 1000 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ (McCaig *et al.*, 2005) e que após amputação desce para $0 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$, daí os extremos no gráfico e a ausência de escala. A linha contínua aponta para a formação de patamares e a linha tracejada para aumentos e diminuições suaves, representando as duas hipóteses possíveis na aquisição de resistência. Epit. – epitélio diferenciado; TEP – potencial transepitelial; WE – epitélio de ferida; AEC – capa epitelial apical.

4.1.3 Potencial de ferida, campo eléctrico lateral e a iniciação da regeneração

A adicionar ao efluxo de K^+ medido anteriormente pelo laboratório (Joana Monteiro, comunicação pessoal), os resultados deste trabalho (Fig. 12C e 14A1) mostraram a existência de um potencial de ferida que infere a presença de um TEP com polaridade positiva (dentro), como expectável (McCaig *et al.*, 2005). Os perfis de Cl^- e Na^+ aqui detectados indicam que o potencial de ferida deve estender-se até cerca de 1-3 hpa, devido à quebra no efluxo de Na^+ e por se tratar de um ponto de inflexão para ambos os iões (Fig. 12C).

O potencial de ferida é um dos componentes do sinal eléctrico epitelial, o outro é o gradiente de voltagem lateral (campo eléctrico) gerado por esta corrente à medida que flui através da pele (Nuccitelli *et al.*, 2008). O EF não pode ser detectado com as técnicas usadas, no entanto considerando outros estudos (Nuccitelli *et al.*, 2008; Huang e Cormie *et al.*, 2008) deve estar presente e ser proximo-distal (EF_{PD} , Fig. 20). Como a magnitude e a polaridade do EF é directamente proporcional à corrente, então alterações nos perfis da dinâmica iónica podem afectar os comportamentos celulares através do EF. Isto é importante porque o EF é o fenómeno bioeléctrico mais relevante para a primeira fase da regeneração, dada a presença na epiderme adjacente à amputação de células epiteliais que migram para o cátodo cobrindo a ferida (Huang e Cormie *et al.*, 2008). O fecho da ferida e consequente formação do WE/AEC são necessários à regeneração. Quando esta não ocorre (Goss, 1956) ou ocorre imediatamente antes de um enxerto de pele madura (Mescher, 1976), há inibição da regeneração. No último caso, Altizer *et al.* (2002) verificou uma correlação com a supressão dos picos de corrente. O sinal bioeléctrico passivo apresenta, inclusive, (relativa) suficiência em anuros (Borgens *et al.*, 1977a), aves (Sisken e Fowler, 1981) e mamíferos (Becker, 1972). Esta compilação de informação (Secção 1.6) e resultados pode levar a uma quase paradoxal interpretação da iniciação da regeneração por eventos biofísicos passivos (Secção 4.1.1). Tais eventos poderão ser melhor entendidos como um “sensor” ubíquo e conservado (provavelmente não o único) de feridas e amputações e ser por isso o primeiro efector da resposta regenerativa.

Há uma questão interessante quando se analisa a galvanotaxia, que é o raio de alcance do EF ser directamente proporcional à sua intensidade. No período imediato à amputação, o raio ronda, em gradiente decrescente, cerca de 1 mm (≈ 100 células, mamífero como referência, McCaig *et al.*, 2005). Este raio é grande pois nesta fase existe um forte potencial de ferida, podendo ser o responsável pela migração de células epiteliais e de tecido conjuntivo (intra-raio) até 2 segmentos ($\approx 200 \mu\text{m}$ cada) observada em peixe-zebra (Poleo *et al.*, 2001). Os fibroblastos (tecido conjuntivo), sofrendo de galvanotaxia catódica (Nuccitelli e Erickson, 1983), podem ser guiados pelos mesmos EFs que afectam as células epiteliais. Nas restantes fases regenerativas os fluxos iónicos são bem menores (Fig. 12C, embora os dados preliminares da densidade de corrente não mostre diminuição aparente, Fig. 14A1) podendo criar um problema de alcance,

nomeadamente na sua presumível função na taxia nervosa (McCaig *et al.*, 2005; Adams *et al.*, 2007; Tseng *et al.*, 2010; modelo Fig. 20). Não obstante, os valores medidos podem ser suficientes e caso não sejam, existe a possibilidade de haver propagação de sinal *via* EFs secundários ou *via* mecanismos moleculares.

4.1.4 Reversão do padrão dos fluxos entre o raio e o inter-raio no início da regeneração

Um fenómeno intrigante ocorre na primeira fase da regeneração 10 mpa: a reversão do padrão de $R < IR$ para $R > IR$ na dinâmica de Cl^- . Duas hipóteses podem explicar este fenómeno: (1) diferentes componentes dos tecidos no R e IR, como a presença de osso no raio e a ausência no inter-raio; e (2) diferente taxa de apoptose que é crucial para a regeneração em *Xenopus* (Tseng *et al.*, 2007). Na fase inicial da apoptose ocorre diminuição do volume (AVD, do inglês *apoptotic volume decrease*) com libertação de grandes quantidades de Cl^- (e também K^+). Como o intervalo de tempo entre o desencadear da apoptose e a fagocitose dos corpos apoptóticos pode ser superior a 1 h (Joaquín León, comunicação pessoal) é possível que o início desta coincida com a fase de $R < IR$. Isto só faria sentido se a taxa apoptótica gerasse um fluxo mensurável e fosse maior no IR. Esta reversão do padrão R/IR não ocorre no perfil de Na^+ , podendo demonstrar um processo dependente/resultante especificamente da dinâmica de Cl^- , como a apoptose. Neste sentido seria interessante ver o comportamento de K^+ , bem como analisar a apoptose. Uma vez que o AVD parece ser um pré-requisito da apoptose (Hoffmann *et al.*, 2009) pode-se estar na presença de um processo activo (de notar que a contribuição passiva epitelial está também presente).

4.1.5 Recuperação do potencial transepitelial

Explorado o primeiro pico de Cl^- e Na^+ (10 mpa), é de interesse explorar a primeira depressão entre 0,5 a 6 hpa (Fig. 12C). Pelo menos duas hipóteses podem ser propostas na interpretação destes resultados: (1) em continuação da hipótese sugerida como mais provável no ponto anterior, até 3 hpa deixa-se de ter muita apoptose nas fases iniciais e deixa de existir libertação de grandes quantidades de Cl^- e K^+ . O grande decréscimo no efluxo de K^+ (Joana Monteiro, comunicação pessoal) apoia esta possibilidade, mas a refutá-la está a formação do WE/AEC nesta altura (fluxos devem vir deste epitélio recém-formado) e a não explicação da subsequente subida de efluxo às 6 hpa; e (2) uma hipótese que pode explicar todos estes eventos é o perfil de recuperação do TEP. De referir que estas hipóteses não são mutuamente exclusivas, podendo estar a ocorrer em simultâneo.

Dubé *et al.* (2010) revelaram o perfil de recuperação do TEP em feridas de mamíferos *in vitro* e *in vivo*. O estudo mostrou que após a ferida o TEP desce para 0 mV e no decorrer da cicatrização sobe mais do que o nível basal (antes da ferida), restabelecendo-se depois neste nível. Isto foi correlacionado com alterações na expressão epidérmica da bomba Na^+/K^+ -ATPase, durante a diferenciação da epiderme.

Quando se cruza este perfil com os resultados de Nuccitelli *et al.* (2008) na medição do EF em feridas de mamíferos e com os resultados deste trabalho (Fig. 12C), parece existir uma sobreposição de fenómenos bioeléctricos. Ou seja, a diminuição do efluxo de Cl^- e Na^+ 1-3 hpa e do EF, corresponderia à sobre-elevação do TEP; e o subsequente aumento do efluxo 6 hpa de Cl^- e Na^+ e do EF à diminuição do TEP para níveis basais. Fisiologicamente, isto seria explicado pelo influxo direccionado de Na^+ promovido pelas bombas Na^+/K^+ -ATPases contrariar o efluxo passivo e activo deste ião devido, respectivamente, à ainda baixa resistência do WE/AEC (possivelmente causada por junções ocludentes incipientes, Hudspeth, 1975) e ao estabelecimento da reversão da corrente com Cl^- (Secção seguinte). De enaltecer que a comparação é fenomenológica e não temporal por se tratar de modelos diferentes.

A principal crítica que pode ser apontada a esta hipótese é o facto de no presente estudo a pele não estar madura (terminalmente diferenciada) às 6 hpa, havendo formação contínua da AEC (estabelecida por volta 12 hpa; Poss *et al.*, 2003).

4.1.6 6 hpa, período-chave da regeneração?

O período temporal 6 hpa parecer ser crucial para o desenrolar da regeneração, podendo mesmo ser um dos pontos-chave em todo o processo regenerativo. Dois fenómenos podem contribuir para a bioelectricidade activa do sistema: o epitélio electrogénico e a polaridade celular. Mostrou-se que a formação de

agregados de células despolarizadas é necessária e até suficiente para a regeneração (Adams *et al.*, 2007), no entanto apenas se sabe que Na^+ não tem influência nesta formação (Tseng *et al.*, 2010) e que o H^+ pode ter (Adams *et al.*, 2007). Desconhece-se o papel do grande efluxo de Cl^- detectado na polaridade celular. Não se podendo excluir a possibilidade de modular de alguma forma este aspecto biofísico, propõe-se aqui que a dinâmica de Cl^- intervém sobretudo na reversão da corrente total. Outro facto interessante que ocorre 6 hpa é a maior diferença entre raio e inter-raio no fluxo de Cl^- e Na^+ que pode revelar um pico de actividade iónica nesta fase, dado o decréscimo contínuo antes e depois desta (Fig. 12D).

Ao contrário do que está estabelecido na literatura clássica (Borgens *et al.*, 1977b) e recente (Reid *et al.*, 2009) que apontam para Na^+ como o principal contribuinte da corrente total, neste estudo o Cl^- parece assumir esse papel pelo menos na corrente de entrada 6 hpa, verificada em *Xenopus* (Reid *et al.*, 2009) e axolotle (Özkucur *et al.*, 2010). Não obstante, tais estudos não excluem a possibilidade do Cl^- ser também importante na formação da corrente. A explicação do efluxo de Cl^- ser mais elevado que nos períodos seguintes pode dever-se ao facto de estar a ocorrer simultaneamente com a recuperação do TEP (Secção anterior) e/ou à quebra da corrente de entrada (como parece apontar a densidade de corrente, Fig. 14A1, ao contrário de *Xenopus*, Reid *et al.*, 2009). Esta reversão, que só ocorre em sistemas regenerantes, provoca também a reversão da polaridade do EF (EF_{DP} , Fig. 20), que passa a ser anódica no regenerado. Tal entrada de corrente pode manter-se pelo menos até à fase de crescimento regenerativo (>48 hpa), devido ao pico de efluxo detectado entre 24-48 hpa (embora a diferença para Na^+ deixar de ser significativa, Fig. 12C, e deixe-se de medir correntes de entrada, Fig. 14A1). Estudos anteriores apontam para uma ligeira maior longevidade, mas também com decréscimo progressivo (Borgens *et al.*, 1977b; Nawata, 2001; Reid *et al.*, 2009).

Por estas razões propõe-se 6 hpa como o período-chave de toda a regeneração, papel até agora atribuído ao período da formação do blastema (24 hpa, Poss *et al.*, 2003). Para testar esta hipótese realizaram-se ensaios farmacológicos para inibir os putativos canais ICl_n e Na_v e, presumivelmente, o padrão de fluxos por eles gerados. No entanto, a modulação dos fluxos de Cl^- com aciclovir apenas consistiu num ensaio pouco robusto sem qualquer efeito no fenótipo e na taxa regenerativa. Tal pode ser explicado pela ausência deste canal em termos de expressão génica neste período (Fig. 17) e possível não ocorrência de transposição citoplasmática para a membrana (Ritter *et al.*, 2003). Não se pode contudo tirar conclusões definitivas devido à preliminaridade do ensaio. Por outro lado, a modulação do influxo de Na^+ afectou o fenótipo e a taxa de regeneração, tal como se verificou em *Xenopus* (Tseng *et al.*, 2010). Os resultados permitem inferir que o influxo de Na^+ 6 hpa (ou até este período) é importante para uma taxa regenerativa normal e morfogénese correcta. A permuta de peixes do meio sem tricaína para o meio com tricaína 8 hpa parece indicar que a regeneração já não depende significativamente de Na_v . Na permuta oposta, a ausência de efeito e até o aumento significativo da taxa regenerativa podem ser explicados por mecanismos de compensação. O possível aumento da taxa de crescimento é um problema interessante a necessitar de mais ensaios. Fazer a permuta 24 e 48 hpa poderá ajudar a esclarecer e a determinar a importância de outros períodos-chave da regeneração.

Nesta interpretação, o que é quase paradoxal é o facto de não ocorrer influxo de Na^+ neste e nos períodos temporais subsequentes, como demonstrado noutros estudos (Reid *et al.*, 2009; Özkucur *et al.*, 2010; Tseng *et al.*, 2010). Adicionalmente, de forma preliminar, a não detecção de influxo não parece ser devida à presença de tricaína (Fig. 16B) ou à baixa concentração de Na^+ no meio (Fig. 16C e D e Secção 3.1.4). Em conjunto, isto revela duas situações a ocorrer em simultâneo: (1) influxo, que tal como demonstrado em Tseng *et al.* (2010) pode activar vias de sinalização genética; e (2) efluxo, que sendo detectado supera o influxo, possivelmente devido à actuação do Na^+ juntamente com o Cl^- na geração e estabilização do EF. Esta simultaneidade lança a possibilidade de haver uma recircularização efectiva de Na^+ , apesar de não se conhecerem estudos na regeneração, nem a existência de canais de Na^+ activados por Na^+ .

No início desta argumentação foi referido que a formação do blastema é tida em geral como a chave da regeneração epimórfica. A discussão apresentada não pretende retirar a importância estabelecida do blastema, mas até suportá-la. As implicações das reversões de corrente e EF são ainda desconhecidas, embora se assuma genericamente a importância das correntes para a galvanotaxia e o galvanotropismo nervosos. Um fenómeno que tem intrigado os cientistas desde à mais de cinco décadas é a dependência da regeneração da enervação e o problema do membro aneurogénico. Primeiro descoberto e muito estudado em urodelos (Singer, 1952) tem-se verificado a transversalidade na filogenia (Brockes e Kumar, 2008), estando também presente em teleósteos (Geraudie e Singer, 1985). Singer e colegas também constataram

que não se devia à componente eléctrica (potenciais de acção) ou motora (*via* neurotransmissores acetilcolina). Da exploração deste fenómeno até à actualidade verificou-se que a contribuição nervosa, tal como o WE/AEC, não é necessária para a formação do blastema, mas para a sua manutenção por estimular *via* factores de crescimento a proliferação no blastema precoce. Mais tarde o estímulo prevalecente era do WE/AEC (Brockes e Kumar, 2008). Um estudo de Kumar *et al.* (2007) demonstrou que esta sequência de dependência pode dever-se a nAG. Este é necessário e suficiente na recuperação de membros aneurogénicos de urodelos e a sua expressão inicial em células de Schwann e depois no WE poderá explicar a transição de importância na manutenção do blastema.

Desde o estudo seminal de Ingvar (1920) que se sabe que os nervos respondem a campos eléctricos exógenos (*in vitro*) e mais tarde *in vivo* (Borgens *et al.*, 1981), e endógenos (Song *et al.*, 2004). As respostas neuronais não seguem sempre o mesmo pólo, embora exista primazia para o cátodo (McCaig *et al.*, 2005). Apesar de se assumir que é um comportamento conservado, Cormie e Robinson (2007) não o detectaram em peixe-zebra e verificaram que só existem evidências para tal resposta *in vitro* em *Xenopus* (Robinson e Cormie, 2007). Apesar desta recente controvérsia já foi publicado um ensaio clínico de fase 1 para tratamento da espinal medula com EFs oscilatórios, com boas indicações em termos de recuperação sensorial, embora sem impacto motor (Shapiro *et al.*, 2005). Uma vez que existe uma pequena regressão nervosa aquando da amputação, sendo os nervos essenciais no blastema precoce e tendo em conta que Shapiro *et al.* (2005) usou EFs oscilatórios, é plausível propor que não só a manutenção do EF de polaridade anódica pode ser importante, como também a reversão do EF pode ser o sinal iniciador do crescimento das fibras nervosas em direcção à zona de formação do blastema (abaixo do WE/AEC).

Em conclusão, 6 hpa pode ser um período-chave por reunir as condições necessárias à formação e identidade posicional do blastema.

4.1.7 Formação e maturação do blastema: previstos bioelectricamente?

Com a reversão ocorrida 6 hpa, pode manter-se uma corrente de entrada até às 48 hpa (embora não suportada pelos dados preliminares de SVET). Estes períodos coincidem com a formação e maturação do blastema e além de guiar os nervos ao longo da regeneração, podem ser importantes noutros aspectos, nomeadamente na padronização. Dois modelos são considerados quando se discute a obtenção de informação posicional pelas células em crescimento no botão do membro: (1) modelo da pré-especificação, onde as células do botão estão já especificadas no seu todo; e (2) modelo da zona de progresso, onde as células ganham identidade consoante o tempo (número de divisões) que passam em tal zona (Summerbell *et al.*, 1973; Gilbert, 2006). Sabendo-se que existem correntes no botão (Altizer *et al.*, 2002), outro mecanismo poderia ser o tempo que as células estão sobre o raio de alcance do EF gerado. Na regeneração poderia ocorrer o mesmo no blastema que começa a diferenciar-se por volta das 48 hpa (pico de Cl^- nesta altura, Fig. 12C). No entanto, não se conhecem estudos em qualquer um dos cenários.

O perfil de expressão génica do putativo canal ICl_n durante a fase de crescimento regenerativo revela que este canal pode ser importante na regeneração.

Assim sendo, neste estudo pode existir uma correlação entre importantes comportamentos celulares – migração, proliferação e diferenciação – e o perfil bioeléctrico. A queda no perfil às 96 hpa e depois em diante é congruente com o início da dissociação do blastema e retorno à actividade mitótica basal, existente antes da amputação.

4.2 Padrões de fluxos raio vs inter-raio, centro vs extremidade e proximal vs distal, que papel?

A exploração do raio e inter-raio partiu da premissa de que, segundo o que é mais consensual na literatura, apenas os raios formam blastemas e que por isso poderiam estabelecer um dipolo eléctrico de curto alcance e garantir assim a electroneutralidade. Uma segunda possibilidade era um dipolo de longo alcance entre o centro e as extremidades, como parece ocorrer em caudas de urodelos (Nawata, 2001). A última possibilidade foi tentar ver dipolos também de longo alcance entre a superfície de amputação e o tecido adjacente ao plano de amputação, como acontece nos membros de anfíbios (Borgens *et al.*, 1977b). Nenhuma destas possibilidades foi viabilizada de forma inequívoca pelos fluxos (principalmente de Cl^-) ou pela densidade de corrente.

Apesar de não se detectar um dipolo efluxo/saída de corrente vs influxo/entrada de corrente entre o R e IR, detectou-se um padrão geral de $R > IR$ (Secção 3.1.2). Tal padrão pode ter importantes implicações morfogénicas na formação e alongamento das bifurcações dos raios, dada a importância das interacções entre R e IR nestes eventos (Murciano *et al.*, 2001; 2002; Marí-Beffa e Murciano, 2010). A densidade de corrente medida antes e depois da bifurcação para averiguar se o padrão $R > IR$ desaparecia 6 hpa depois da bifurcação não foi conclusiva (Fig. 14C). Neste ensaio 48 hpa foi o controlo negativo estabelecido à partida, por saber-se que neste período já não existem diferenças entre R e IR. Não obstante, como só no raio existem fibras nervosas, a actividade bioeléctrica pode ser maximizada de alguma forma ainda não conhecida, dada a necessidade dos nervos para a regeneração.

No caso dos padrões entre centro/extremidade, *i.e.*, entre a intersecção dorso-ventral dos lóbulos e proximal/distal, a sua importância poderá ser mais mitogénica, devido ao crescimento diferencial dos pares. Dados robustos do grupo de inserção mostraram um claro perfil de H^+ antecipado e intensificando no regenerado proximal em relação ao distal (Joana Monteiro, dados não publicados), sustentando os resultados preliminares positivos da dinâmica iónica neste estudo, mas inconclusivos da densidade de corrente (Secção 3.1.3).

4.3 Modelo bioeléctrico da regeneração

Numa conclusão geral este estudo contribui para apoiar a hipótese biofísica da regeneração, em que fenómenos bioeléctricos são eventos epigenéticos e não epifenómenos da regeneração. O modelo da Fig. 20 resume toda a interacção entre os eventos bioeléctricos e a regeneração.

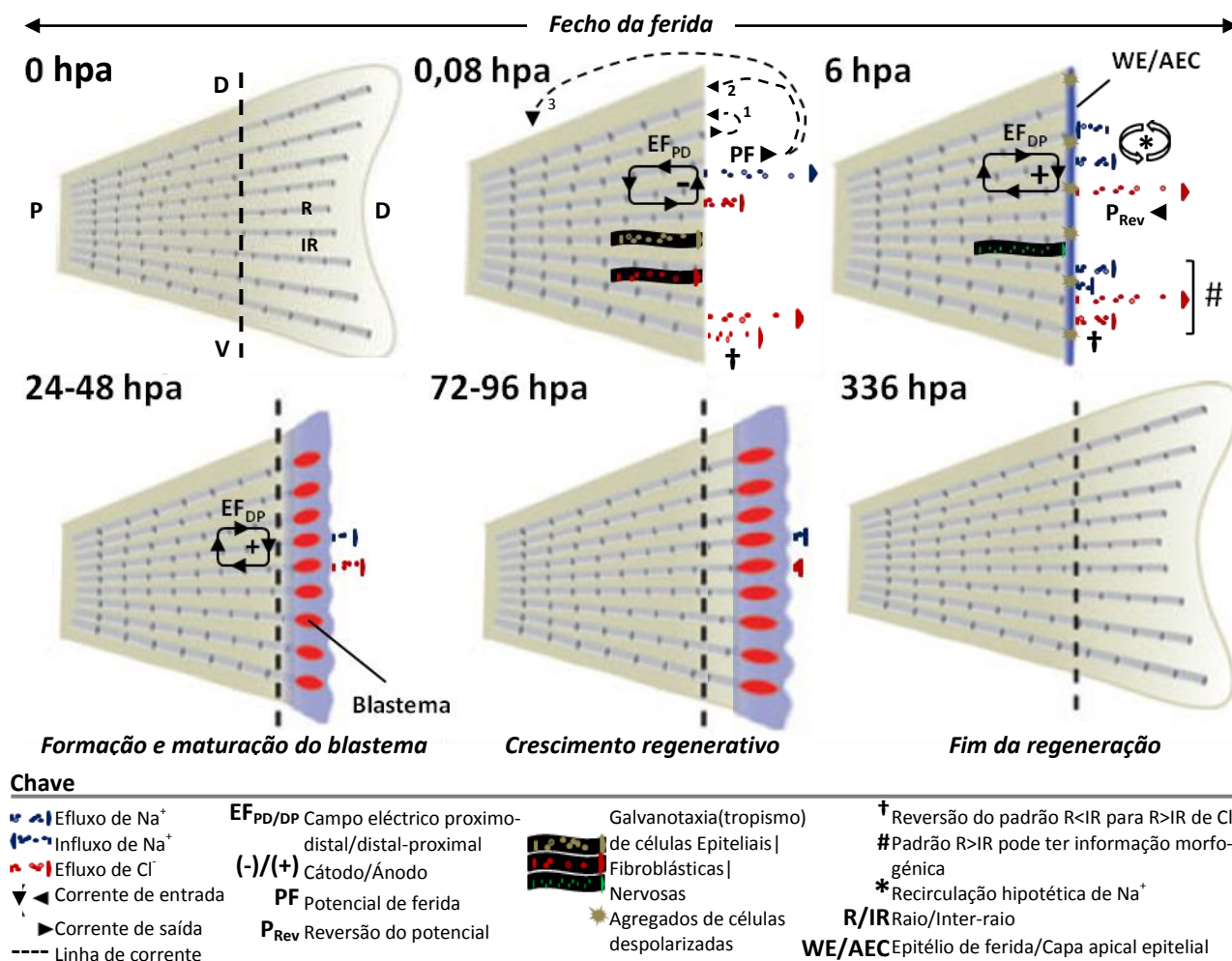


Fig. 20 Modelo bioeléctrico da regeneração 0 hpa Barbatana caudal intacta e respectivos eixos: P/D – proximo-distal; D/V – dorso-ventral. 0,08 hpa/10 mpa Com a amputação gera-se imediatamente um potencial de ferida devido ao grande efluxo de Na^+ detectado (também ocorre efluxo de menor intensidade de Cl^- e K^+). Associado a esta corrente de saída, deve haver reentrada de corrente (setas tracejadas a preto) no inter-raio (1) ou na extremidade (2) ou no tecido adjacente ao plano de amputação (3). Em conjunto,

isto cria um campo eléctrico lateral proximo-distal, com o cátodo na superfície amputada. A migração catódica de células epiteliais, cobre a ferida e a migração também catódica de fibroblastos irá dar a informação posicional necessária à formação do blastema. Reversão do padrão $R < IR$ (10 hpa) para $R > IR$ (restantes períodos) de Cl^- (*). **6 hpa** Possível início da formação do blastema, quando provavelmente o TEP já recuperou e o grande efluxo de Cl^- gera uma corrente de entrada que reverte o EF, sendo o sinal para a migração nervosa. Esta migração juntamente com a presumível formação de agregados de células despolarizadas irá dar origem à proliferação activa do primeiro grupo de células do blastema abaixo do WE/AEC a partir das 24 hpa. O influxo de Na^+ pode iniciar a activação de cascatas genéticas auto-limitadas que irão ser efectoras da regeneração. Este paradoxo de haver influxo não mensurável, pois valor líquido deu sempre efluxo, faz lançar a hipótese de recircularização de Na^+ (*). O padrão $R > IR$ de Cl^- e Na^+ pode ser importante para a formação da bifurcação (#). **24-48 hpa** O efluxo de Cl^- diminui, o que deve baixar o EF. Não obstante, este ainda deve exercer um papel na taxa nervosa. Outra possibilidade, não mutuamente exclusiva, é este pequeno EF dar informação posicional às células em (re)diferenciação consoante o tempo que passam dentro do raio de alcance do campo. **72-96 hpa** Continua a diminuição dos fluxos iónicos. **336 hpa** A partir das 96 hpa começa a dissociação do blastema e a passagem para a regeneração homeostática de crescimento contínuo. Comprimento das setas é uma análise relativa (e não absoluta) dos valores de fluxos medidos. Linha tracejada a preto – plano de amputação. Esquema da regeneração adaptado de Kawakami (2010).

4.4 Perspectivas futuras

Além das perspectivas futuras apresentadas ao longo da discussão seria ainda de interesse: (1) realizar vários ensaios de integração bioeléctrica e molecular: (a) medir fluxos após inibição farmacológica com aciclovir e tricaína, para despistar eventuais mecanismos de compensação e/ou outras funções dos putativos canais, (b) confirmar a presença do putativo canal candidato para fluxos de Na^+ (Na_v) por hibridação *in situ* e fazer mais ensaios para determinar a janela onde o influxo de Na^+ é necessário à regeneração, (c) fazer mais ensaios farmacológicos com aciclovir, (d) aquando da modulação dos translocadores ver o efeito na expressão da via de sinalização Wnt (Stoick-Cooper *et al.*, 2007a) e outras envolvidas na regeneração (*e.g.*, Fgf), (e) fazer ensaios de sobre-expressão de ICl_n e Na_v e outros putativos candidatos para ver se existe aumento da taxa regenerativa e do nível de expressão da via Wnt; (2) suportar com mais ensaios a despistagem da influência da tricaína e da concentração de Na^+ nos fluxos deste ião; (3) suportar com mais ensaios descritivos o padrão centro/extremidade e próximo/distal; (4) conduzir ensaios de imagiologia iónica para avaliar a dinâmica intracelular (Özkucur *et al.*, 2010); (5) tendo por base o estudo de Wills *et al.* (2008), que numa perspectiva filogenética da capacidade regenerativa mostrou que em peixes as vias de sinalização genéticas na regeneração homeostática devem ser as mesmas da regeneração (facultativa), inibir de forma sistémica o crescimento dos peixes e analisar a regeneração fenotipicamente e bioelectricamente; (6) partindo do estudo de Conboy *et al.* (2005) que mostrou o reverter do envelhecimento ontogénico de células progenitoras por exposição a um novo ambiente sistémico e a noção geral da perda de capacidade regenerativa com a idade (Rando *et al.*, 2006), comparar as taxas regenerativas e actividade bioeléctrica de animais muito novos e muito velhos, e no caso de variarem mostrar assim que os fenómenos bioeléctricos prevêm a regeneração; e (7) dada a completa “reversão” em termos de equilíbrios osmóticos entre os peixes de água doce e água salgada, medir os fluxos num modelo animal marinho.

“Se eu não morresse, nunca! E eternamente buscasse e conseguisse a perfeição das coisas!”

Cesário Verde

Bibliografia | 4

- Adams, D., Masi, A. and Levin, M. 2007. H⁺ pump-dependent changes in membrane voltage are an early mechanism necessary and sufficient to induce *Xenopus* tail regeneration. *Development* 134: 1323-1335.
- Akimenko, M., Marí-Beffa, M., Becerra, J. and Géraudie, J. 2003. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics* 226: 190-201.
- Altizer, A., Stewart, S., Albertson, K. and Borgens, R. 2002. Skin flaps inhibit both the current of injury at the amputation surface and regeneration of that limb in newts. *Journal of Experimental Zoology* 293: 467-477.
- Alvarado, A. and Tsonis, P. 2006. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics* 7: 873-884.
- Azevedo, C. 2005. Biologia Celular e Molecular. 4a ed. *Lidel*.
- Becker, R. 1972. Stimulation of partial limb regeneration in rats. *Nature* 235: 109-111.
- Bely, A. and Nyberg, K. 2009. Evolution of animal regeneration – re-emergence of a field. *Cell* 25: 161-170.
- Binggeli, R. and Weinstein, R. 1986. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *Journal of Theoretical Biology* 123: 377-401.
- Borgens, R., Venable J. and Jaffe, L. 1977a. Bioelectricity and regeneration. I. Initiation of frog limb regeneration by minute currents. *Journal of Experimental Zoology* 200: 403-416.
- Borgens, R., Venable, J. and Jaffe, L. 1977b. Bioelectricity and regeneration: initiating of frog limb regeneration by minute currents. *Journal of Experimental Zoology* 200: 403-416.
- Borgens, R., Roederer, E. and Cohen, M. 1981. Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields. *Science* 213: 611-617.
- Brookes, J. and Kumar, A. 2008. Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 356-CB24-21 525-549.
- Campbell, L. and Crews C. 2008. Wound epidermis formation and function in urodele amphibian limb regeneration. *Cell Molecular Life Science* 65: 73-79.
- Carlson, B. 1974. Morphogenetic interactions between rotated skin cuffs and underlying stump tissues in regenerating axolotl forelimbs. *Developmental Biology* 39: 263-285.
- Carlson, B. 2007. Principles of Regeneration. *London: Elsevier*.
- Ceradini, D., Kulkarni, A., Callaghan, M., Tepper, O., Bastidas, N., Kleinman, M., Capla, J., Galiano, R., Levine, J. and Gurtner, C. 2004. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine* 10: 858-864.
- Christensen, R. and Tassava, R. 2000. Apical epithelial cap morphology and fibronectin gene expression in regenerating axolotl limbs. *Developmental dynamics* 217: 216-24.
- Conboy, I., Conboy, J., Wagers, A., Girma, E., Weissman, I. and Rando, T. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433, 760-764.
- Cormie, P. and Robinson, K. 2007. Embryonic zebrafish neuronal growth is not affected by an applied electric field in vitro. *Neuroscience Letters* 411: 128-132.
- Dubé, J., Rochette, O., Lévesque, P., Gauvin, R., Roberge, C., Auger, F., Goulet, D., Bourdages, M., Plante, M., Germain, L. and Moulin, V. 2010. Restoration of the transepithelial potential within tissueengineered human skin in vitro and during the wound healing process in vivo. *Tissue Engineering Part A* 1-33.
- Dufourcq, P. and Vríz, S. 2006. The chemokine SDF-1 regulates blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development Genes and Evolution* 216: 635-639.
- Endo, T., Bryant, S. and Gardiner, D. 2004. A stepwise model system for limb regeneration. *Developmental Biology* 270: 135-145.
- Evans, D. 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295: 704-13.
- Ferreira, F. 2008. Regeneração das extremidades, uma perspectiva da genética e da bioquímica celular – o estado da arte. *Repositorium da Universidade do Minho*

- Geraudie, J. and Singer, M. 1985. Necessity of an adequate nerve supply for regeneration of the amputated pectoral fin in the teleost *Fundulus*. *Journal of Experimental Zoology* 234: 367-74.
- Gilbert, S. 2006. Developmental Biology. 8th ed. *Sinauer Associates*.
- Goss, R. 1956. Regenerative inhibition following limb amputation and immediate insertion into the body cavity. *The Anatomical Record* 126: 15-27.
- Gschwentner, M., Susanna, A., Woll, E., Ritter, M., Nagl, U., Schmarda, A., Laich, A., Pinggera, G., Iemunter, H., Huemer, H., Deetjen, P. and Paulmichl, M. 1995. Antiviral Drugs from the Nucleoside Analog Family Block Volume-Activated Chloride Channels. *Molecular Medicine* 1: 407-417.
- Han, M., Yang, X., Taylor, G., Burdsal, C., Anderson, R. and Muneoka, K. 2005. Limb regeneration in higher vertebrates: Developing a roadmap. *Anatomical Record Part B New Anatomist* 287: 14-24.
- Hedrick, M. and Winmill, R. 2003. Excitatory and inhibitory effects of tricaine (MS-222) on fictive breathing in isolated bullfrog brain stem. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284: 405-412.
- Holder, N. 1989. Organization of connective tissue patterns by dermal fibroblasts in the regenerating axolotl limb. *Development* 105: 585-593.
- Hoffmann, E., Lambert, I. and Pedersen, S. 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiological Reviews* 89: 193-277.
- Huang, L. and Cormie, P., Messerli, M. and Robinson, K. 2008. The Involvement of Ca²⁺R and Integrins in Directional Responses of Zebrafish Keratocytes to Electric Fields. *Journal of Cellular Physiology* 162-172.
- Hudspeth, A. 1975. Establishment of tight junctions between epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72: 2711-2713.
- Ingvar, S. 1920. Reactions of cells to the electric current in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 17: 198-199.
- Iwama, G., McGeer, J. and Pawluk, M. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, cortisol and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology* 67: 2565-2573.
- Iwata, M., Nishioka, R. and Bern, H. 1987. Whole animal transepithelial potential (TEP) of coho salmon during the parr-smolt transformation and effects of thyroxine, prolactin and hypophysectomy. *Fish Physiology and Biochemistry* 3: 25-38.
- Jaffe, L. and Nuccitelli, R. 1974. An ultrasensitive vibrating probe for measuring extracellular currents. *Journal of Cell Biology* 63: 614-28.
- Jaffe, L. and Levy, S. 1987. Calcium gradients measured with a vibrating calcium-selective electrode. *Institute of Electrical and Electronics Engineers Conference* 9: 779-781.
- Jenkins, L., Duerstock, B. and Borgens, R. 1996. Reduction of the current of injury leaving the amputation inhibits limb regeneration in the red spotted newt. *Developmental Biology* 178: 251-262.
- Johnson, S. and Weston, J. 1995. Temperature-sensitive mutations that cause stage-specific defects in Zebrafish fin regeneration. *Genetics* 141, 1583-1595.
- Kawakami, A. 2010. Stem cell system in tissue regeneration in fish. *Development, Growth & Differentiation* 52: 77-87.
- Kimura, Y., Madhavan, M., Call, M., Santiago, W., Tsonis, P., Lambris, J. and Del Rio-Tsonis, K. 2003. Expression of complement 3 and complement 5 in newt limb and lens regeneration. *Journal of Immunology* 170: 2331-2339.
- Koefoed-Johnsen, V. and Ussing, H. 1958. On the nature of the frog skin potential. *Acta Physiologica Scandinavica* 42: 298-308.
- Kühtreiber, W. and Jaffe, L. 1990. Detection of extra-cellular calcium gradients with a calcium-specific vibrating electrode. *Journal of Cell Biology* 110: 1565-1573.
- Kumar, A., Godwin, J., Gates, P., Garza-Garcia, A. and Brockes, J. 2007. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science* 318: 772-777.
- Larkin, D., Murphy, D., Reilly, D., Cahill, M., Sattler, E., Harriott, P., Cahill, D. and Moran, N. 2004. ICln, a Novel Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Associated Protein, Functionally Regulates Platelet Activation. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 27286-27293.
- Lee, Y., Grill, S., Sanchez, A., Murphy-Ryan, M. and Poss, K. 2005. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development* 132: 5173-5183.

- Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K., Nogi, T. and Mercola, M. 2002. Asymmetries in H^+/K^+ -ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111: 77-89.
- Levin, M. 2007. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends in Cell Biology* 17: 261-270.
- Levin, M. 2009. Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 543-556.
- Marí-Beffa, M. and Murciano, C. 2010. Dermoskeleton morphogenesis in zebrafish fins. *Developmental Dynamics* 239: 2779-2794.
- Marsh, G. and Beams, H. 1950. Electrical control of growth axis in a regenerating annelid. *The Anatomical Record* 108: 512-612.
- Matzkea, A., Weigerb, T. and Matzkea, M. 2010. Ion Channels at the Nucleus: Electrophysiology Meets the Genome. *Molecular Plant* 3: 642-652.
- McCaig, C., Rajniecek, A., Song, B. and Zhao, M. 2005. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. *Physiological Reviews* 85: 943-978.
- McCaig, C., Song, B. and Rajniecek, A. 2009. Electrical dimensions in cell science. *Journal of Cell Science* 122: 4267-4276.
- Meinhardt, H. 1983. A boundary model for pattern formation in vertebrate limbs. *Journal of Embryology Experimental Morphology* 76: 115-137.
- Mescher, A. 1976. Effects on adult newt limb regeneration of partial and complete skin flaps over the amputation surface. *Journal of Experimental Zoology* 195: 117-128.
- Morgan, T. 1906. The physiology of regeneration. *Journal Experimental Zoology* 3: 457-503.
- Morrison, J., Loof, S., He, P. and Simon, A. 2006. Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population. *Journal of Cell Biology* 172: 433-440.
- Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K. and Okamura, Y. 2005. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* 435: 1239-1243.
- Murciano, C., Ruiz, J., Maseda, D., Fernández, T., Durán, I., Marín-Girón, F., Becerra, J. and Marí-Beffa, M. 2001. Ray and inter-ray blastemas interact to control bifurcations of *Danio rerio* fin rays. *International Journal of Developmental Biology* 45: 129-130.
- Murciano, C., Fernández, T., Durán, I., Maseda, D., Ruiz, J., Becerra, J., Akimenko, M. and Marí-Beffa, M. 2002. Ray-interray interactions during fin regeneration of *Danio rerio*. *Developmental Biology* 252: 214-224.
- Nabrit, S. 1929. The role of the fin rays in the regeneration in the tail fins of fishes (in *Fundulus* and goldfish). *The Biological Bulletin* 56: 235-266.
- Nawata, T. 2001. Wound currents following amputation of tail tip in the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zoological Science* 18: 11-15.
- Nuccitelli, R. and Erickson, C. 1983. Embryonic-cell motility can be guided by physiological electric-fields. *Experimental Cell Research* 147: 195-201.
- Nuccitelli R. 2004. A role for endogenous electric fields in wound healing. *Current Topics in Developmental Biology* 58: 1-26.
- Nuccitelli, R., Nuccitelli, P., Ramlatchan, S., Sanger, R. and Smith, P. 2008. Imaging the electric field associated with mouse and human skin wounds. *Wound Repair Regeneration* 16: 432-441.
- Oviedo, J., Morokuma, J., Walentek, P., Kema, I., Gu, M., Ahn, J., Hwang, J., Gojobori, J. and Levin, M. 2010. Long-range neural and gap junction protein-mediated cues control polarity during planarian regeneration. *Developmental Biology* 339: 188-199.
- Özkucur, N., Epperlein, H. and Funk, R. 2010. Ion Imaging During Axolotl Tail Regeneration *In Vivo*. *Developmental Dynamics* 239: 2048-2057.
- Poleo, G., Brown, C., Laforest, L. and Akimenko, M. 2001. Cell proliferation and movement during early fin regeneration in zebrafish. *Developmental Dynamics* 221: 380-390.
- Poss, K., Keating, M. and Nechiporuk, A. 2003. Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental Dynamics* 226: 202-210.
- Poss, K. 2010. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nature Reviews Genetics* 11: 710-722.
- Rakers, S., Gebert, M., Uppalapati, S., Meyer, W., Maderson, P., Sell, A., Kruse, C. and Paus, R. 2009. 'Fish matters': the relevance of fish skin biology to investigative dermatology. *Experimental Dermatology* 19: 313-324.

- Rando, T. 2006. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441: 1080-1086.
- Reid, B., Song, B., McCaig, C. and Zhao, M. 2005. Wound healing in rat cornea: the role of electrical currents. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 19: 379-386.
- Reid, B., Nuccitelli, R. and Zhao, M. 2007. Non-invasive measurement of bioelectric currents with a vibrating probe. *Nature Protocols* 2: 661-669.
- Reid, B., Song, B. and Zhao, M. 2009. Electric currents in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Developmental Biology* 335: 198-207.
- Ritter, M., Ravasio, A., Jakab, M., Chwatal, S., Fürst, J., Laich, A., Gschwentner, M., Signorelli, S., Burtscher, S., Eichmüller, S. and Paulmichl, M. 2003. Cell Swelling Stimulates Cytosol to Membrane Transposition of ICln. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 50163-50174.
- Robinson, K. and Cormie, P. 2007. Electric Field Effects on Human Spinal Injury: Is There a Basis in the In Vitro Studies? *Developmental Neurobiology* 68: 274-280.
- Santos-Ruiz L., Santamaria J., Ruiz-Sanchez J. and Becerra J. 2002. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Developmental Dynamics* 223: 262-272.
- Shapiro, S., Borgens, R., Pascuzzi, R., Roos, K., Groff, M., Purvines, S., Rodgers, R., Hagy, S. and Nelson, P. 2005. Oscillating field stimulation for complete spinal cord injury in humans: a Phase 1 trial. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2: 3-10.
- Shi, R. and Borgens, R. 1994. Embryonic neuroepithelium sodium transport, the resulting physiological potential, and cranial development. *Developmental Biology* 165: 105-116.
- Shipley, A. and Feijó, J. 1999. The use of the vibrating probe technique to study steady extracellular currents during pollen germination and tube growth. *Fertilisation in Higher Plants: Molecular and Cytological Aspects* 235-250.
- Singer, M. 1952. The influence of the nerve in regeneration of the amphibian extremity. *The Quarterly Review of Biology* 27: 169-200.
- Sisken, B. and Fowler, I. 1981. Induction of limb regeneration in the chick-embryo. *The Anatomical Record* 199: A238-A239.
- Smith, P., Hammar, K., Porterfield, M., Sanger, R. and Trimarchi, J. 1999. Self-Referencing, Non-Invasive, Ion Selective Electrode for Single Cell Detection of Trans-Plasma Membrane Calcium Flux. *Microscopy Research and Technique* 46: 398-417.
- Song, B., Zhao, M., Forrester, J. and McCaig, C. 2004. Nerves are guided and nerve sprouting is stimulated by a naturally occurring electrical field in vivo. *Journal of Cell Science* 117: 4681-4690.
- Spallanzani, A. 1769. An essay on animal reproductions. (Translated in English by Maty M.) London: T. Beck-et.
- Stewart, S., Rojas-Muñoz, A. and Belmonte, J. 2007. Bioelectricity and epimorphic regeneration. *Bioessays* 29: 1133-1137.
- Stoick-Cooper, C., Moon, R. and Weidinger, G. 2007b. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes & Development* 21: 1292-1315.
- Stoick-Cooper, C., Weidinger, G., Riehle, K., Hubbert, C., Major, M., Fausto, N. and Moon, R. 2007a. Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. *Development* 134: 479-489.
- Summerbell, D., Lewis, H. and Wolpert, L. 1973. Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature* 24: 492-496.
- Sundelacruz, S., Levin, M. and Kaplan, D. 2009. Role of Membrane Potential in the Regulation of Cell Proliferation and Differentiation. *Stem Cell Reviews and Reports* 5: 231-246.
- Tseng, A., Adams, D., Qiu, D., Koustubhan, P. and Levin, M. 2007. Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Developmental Biology* 301: 62-69.
- Tseng, A., Beane, W., Lemire, J., Masi, A. and Levin, M. 2010. Induction of Vertebrate Regeneration by a Transient Sodium Current. *Development/Plasticity/Repair* 30: 13192-13200.
- Tyler, S. 2003. Epithelium – The Primary Building Block for Metazoan Complexity. *Integrative and Comparative Biology* 43: 55-63.
- Wills, A., Kidd, A., Lepilina, A. and Poss, K. 2008. Fgfs control homeostatic regeneration in adult zebrafish fins. *Development* 135: 3063-3070.
- Zhao, M., Forrester, J. and McCaig C. 1999. Physiological electric fields orient the axis of cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 4942-4946.

- Zhao, M., Song, B., Pu, J., Wada, T., Reid, B., Tai, G., Wang, F., Guo, A., Walczysko, P., Gu, Y., Sasaki, T., Suzuki, A., Forrester, J., Bourne, H., Devreotes, P., McCaig, C. and Penninger, J. 2006. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinasegamma and PTEN. *Nature* 442: 457-460.
- Zhao, M. 2009. Electrical fields in wound healing – An overriding signal that directs cell migration. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 674-682.

I Optimização do eléctrodo de Cl em relação ao diâmetro da ponta e coluna de ionóforo

Tabela 1 Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu\text{m}$ com 3 colunas de ionóforo diferentes, num suporte de imersão, para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Suporte de imersão		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 25 \mu\text{m}$	<i>n</i>	$\pm 40 \mu\text{m}$	<i>n</i>	$\pm 55 \mu\text{m}$	<i>n</i>
5 min	Único	Sem derrame	1	Sem derrame	4	Sem derrame	1
1 h	Único	Separação de interface	2	Sem derrame	2	Derrame de $\pm 20 \mu\text{m}$ Sem derrame	1 1
	2	Sem derrame	1	Sem derrame	1	Sem derrame	1
2 h	2	Derrame de toda	1	Sem derrame	1	Derrame de $\pm 33 \mu\text{m}$	1
	3	Separação de interface	1	Derrame de toda	1	Derrame de $\pm 20 \mu\text{m}$	1
3 h	3	-	-	Sem derrame	1	-	-
	4	-	-	-	-	Derrame de $\pm 33 \mu\text{m}$	1
4h	5	-	-	Derrame de $\pm 13 \mu\text{m}$	1	-	-
	6	-	-	-	-	Derrame de $\pm 33 \mu\text{m}$	1
	Único	Sem derrame	1	Derrame de $\pm 26 \mu\text{m}$	1	Separação de ionóforo	1
Noite	Único	Sem derrame	1	-	-	-	-

Tabela 2 Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu\text{m}$ com 3 colunas diferentes de ionóforo em resposta à calibração e depois desta para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Calibração		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 25 \mu\text{m}$		$\pm 40 \mu\text{m}$		$\pm 55 \mu\text{m}$	
		Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)
		-	-	303,50	5	-	-
		-	-	253,90	3	-	-
		-	-	174,13	3	-	-
		-	-	-64,69	11	-	-
Post calib,	3	Separação de interface		Derrame de $\pm 20 \mu\text{m}$		Separação de ionóforo	
		-	-	304,60	5	294,54	5
		-	-	259,04	3	252,68	3
		-	-	171,38	3	170,45	3
		-	-	-68,70	11	-62,04	11
30 min	4	Separação de interface		Separação de interface (derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$)		Separação de ionóforo	
1 h	5	-		Separação de ionóforo (derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$)		Separação de ionóforo	
1:30 h	6	-		União de ionóforo (derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$)		União de ionóforo (derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$)	

Tabela 3 Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu\text{m}$ com 3 colunas de ionóforo diferentes em resposta à fonte artificial e depois desta para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Fonte artificial		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 25 \mu\text{m}$		$\pm 40 \mu\text{m}$		$\pm 55 \mu\text{m}$	
		Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)
		-	-	278,95	5	-	-
		-	-	217,30	3	-	-
		-	-	168,06	2	-	-
		-	-	-55,45	10	-	-
Fonte artificial							
1 h		-	-	296,69	5	-	-
		-	-	234,71	3	-	-
		-	-	186,63	2	-	-
		-	-	-55,03	10	-	-
1:30 h	10			Derrame de $\pm 13 \mu\text{m}$			

Nota Bien

(1) Para cada grupo de aquisição de dados do plano de medições é preciso um eléctrodo que se mantenha estável durante a medição de 3 peixes ($\pm 3\text{h}$), que corresponde a ± 6 contactos no meio. Além disto, sabendo-se que uma menor coluna de ionóforo dá um sinal melhor, logo o eléctrodo optimizado é aquele que apresenta uma coluna de $\pm 40 \mu\text{m}$.

(2) Os resultados são satisfatórios para o diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu\text{m}$, no entanto testaram-se outros com piores resultados (dados não mostrados). Assim, este é o diâmetro seleccionado para as medições.

(3) O tempo optimizado a aguardar para a estabilização do valor da voltagem para cada solução é 5, 3 e 2 min para 0,1; 1 e 10 mM de KCl, respectivamente.

II Optimização do eléctrodo de Na^+ em relação ao diâmetro da ponta e coluna de ionóforo

Tabela 4 Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 3 \mu\text{m}$ com 3 colunas de ionóforo diferentes, num suporte de imersão, para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Suporte de imersão		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 100 \mu\text{m}$		$\pm 130 \mu\text{m}$		$\pm 160 \mu\text{m}$	
			<i>n</i>		<i>n</i>		<i>n</i>
5 min	Único	Sem derrame	1	Derrame de $\pm 13 \mu\text{m}$	1	Sem derrame	1
1 h	Único	Sem derrame	1	Sem derrame	2	Sem derrame	2
		Derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$	1				
	2	Sem derrame	1	-	-	-	-
2 h	Único	Derrame de $\pm 26 \mu\text{m}$	2	Sem derrame	2	Sem derrame	2
	2	Derrame de $\pm 13 \mu\text{m}$	1	Derrame de $\pm 33 \mu\text{m}$	2	Derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$	2
		Derrame de mais $\pm 7 \mu\text{m}$	1				
	3	Sem derrame	1	-	-	-	-
3 h	Único	Derrame de $\pm 7 \mu\text{m}$	1	Sem derrame	1	Sem derrame	1
	2	Derrame de mais $\pm 26 \mu\text{m}$	1	Sem derrame	1	Sem mais derrame	2
		Derrame de mais $\pm 20 \mu\text{m}$	1	Derrame de $\pm 13 \mu\text{m}$	1		
	3	Sem derrame	2	Derrame de mais $\pm 13 \mu\text{m}$	2	Derrame de mais $\pm 7 \mu\text{m}$	1
						Sem mais derrame	1
	4	Sem derrame	1	-	-	-	-
Noite	2	Derrame de $\pm 20 \mu\text{m}$	1	Sem derrame	1	Sem derrame	1
	3	Derrame de mais $\pm 26 \mu\text{m}$	1	Sem derrame	1	Sem mais derrame	2
		Sem mais derrame	1	Derrame de mais $\pm 26 \mu\text{m}$	1		
	4	Derrame de mais $\pm 13 \mu\text{m}$	1	Derrame de mais $\pm 20 \mu\text{m}$	2	Derrame de mais $\pm 7 \mu\text{m}$	1
		Derrame de mais $\pm 20 \mu\text{m}$	1			Derrame de mais $\pm 7 \mu\text{m}$	1
	5	Sem derrame	1	-	-	-	-

Tabela 5a Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 3 \mu\text{m}$ com 3 colunas de ionóforo diferentes em resposta à calibração e depois desta para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Calibração		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 100 \mu\text{m}$		$\pm 130 \mu\text{m}$		$\pm 160 \mu\text{m}$	
		Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)
		-70,35	4	-69,06	4	-67,20 4	4
		-24,38	2	-24,82	2	-24,17 2	2
		31,75	2	30,57	2	31,82 2	2
		51,05	8	49,81	8	49,51 8	8
30 min	6	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	
		-69,24	4	-70,10	4	-68,10 4	4
		-26,50	2	-25,60	2	-26,10 2	2
		29,85	2	30,82	2	30,05 2	2
		49,55	8	50,46	8	49,07 8	8
30 min	6	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	
1 h	7	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	
Noite	8	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	
Noite	9	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	

Tabela 5b Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu\text{m}$ com 3 colunas diferentes de ionóforo em resposta à calibração e depois desta para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Calibração		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 40 \mu\text{m}$		$\pm 65 \mu\text{m}$		$\pm 130 \mu\text{m}$	
		Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)
		-75,76	4	-69,84 4	4	-65,65	4
		-24,25	2	-22,10 2	2	-20,86	2
		31,70	2	33,68 2	2	34,49	2
		53,73	8	51,76 8	8	50,07	8
30 min	6	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	
		-65,10	4	-	-	-67,60	4
		-19,78	2	-	-	-20,13	2
		35,81	2	-	-	35,57	2
		50,45	8	-	-	51,58	8
30 min	6	Sem derrame		-		Sem derrame	
1 h	7	Sem derrame (1) Derrame de $\pm 13 \mu\text{m}$ (1)		Sem derrame		Sem derrame	
Noite	8	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	
Noite	9	Sem derrame		Sem derrame		Sem derrame	

Tabela 6 Caracterização dos eléctrodos de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu\text{m}$ com 3 colunas de ionóforo diferentes em resposta à fonte artificial para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos (calibração com tricaína)

Fonte artificial		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 40 \mu\text{m}$		$\pm 65 \mu\text{m}$		$\pm 130 \mu\text{m}$	
		Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)	Voltagem (mV)	Tempo (min)
		-	-	-67,60	4	-	-
		-	-	-22,36	2	-	-
		-	-	33,23	2	-	-
		-	-	50,42	8	-	-
Fonte artificial							
1 h	3	-	-	-65,88	4	-	-
		-	-	-22,63	2	-	-
		-	-	33,80	2	-	-
		-	-	49,84	8	-	-
1:30 h	7	-	-	Sem derrame		-	-
Noite	8	-	-	Sem derrame		-	-

Nota Bien

(1) Para cada grupo de aquisição de dados do plano de medições é preciso um eléctrodo que se mantenha estável durante a medição de 3 peixes ($\pm 3h$), que corresponde a ± 6 contactos no meio. Além disto, sabendo-se que uma menor coluna de ionóforo dá um sinal melhor, logo o eléctrodo optimizado é aquele que apresenta um diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu m$ e uma coluna de $\pm 65 \mu m$.

(2) Mas, uma vez que dentro do período das medições dos fluxos de Na^+ não ocorreu praticamente nenhum derrame de ionóforo, com uma coluna e eléctrodo estáveis por muito tempo (1 dia a 1 semana de medições), passou-se a usar uma coluna de ionóforo de $\pm 40 \mu m$ (e a mesmo diâmetro da ponta).

(3) O tempo optimizado a aguardar para a estabilização do valor da voltagem para cada solução é 4, 2 e 2 min para 0,1; 1 e 10 mM de NaCl, respectivamente.

III Efeito da tricaína nos eléctrodos

Tabela 7 Caracterização dos eléctrodos de Cl^- de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu m$ com 2 colunas de ionóforo diferentes em resposta à calibração com e sem tricaína e depois desta para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Calibração		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo			
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 40 \mu m$		$\pm 65 \mu m$	
		Sem Tricaína mV min	Com Tricaína mV min	Sem Tricaína mV min	Com Tricaína mV min
		322,49 6	-	-	303,25 10
		232,59 5	-	-	249,33 5
		152,15 3	-	-	165,04 4
		-85,17 14	-	-	-68,70 19
25 min	4	Separação de ionóforo		Separação de ionóforo	
		307,05 5	281,54 5	293,48 7	298,04 6
		241,27 4	291,05 3	245,66 5	247,83 4
		153,99 3	166,43 3	155,63 5	163,88 4
		-76,53 12	-57,56 11	-68,93 17	-67,08 14
30 min	6	18,97 1 Derrame de $\pm 7 \mu m$		1,85 3 Sem derrame	

Tabela 8 Caracterização dos eléctrodos de Na^+ de diâmetro da ponta de $\approx 7 \mu m$ com 3 colunas de ionóforo diferentes em resposta à calibração com e sem tricaína e depois desta para diferentes tempos pós-contacto e número de contactos

Calibração		Colunas de ionóforo e derrame de ionóforo					
Tempo pós-contacto	Número de contactos	$\pm 40 \mu m$		$\pm 65 \mu m$		$\pm 130 \mu m$	
		Sem Tricaína mV min	Com Tricaína mV min	Sem Tricaína mV min	Com Tricaína mV min	Sem Tricaína mV min	Com Tricaína mV min
		-75,76 4	-71,26 6	-69,84 4	-63,86 3	-65,65 4	-60,20 4
		-24,25 2	-28,32 3	-22,10 2	-22,29 2	-20,86 2	-22,10 2
		31,70 2	29,66 2	33,68 2	33,01 2	34,49 2	33,09 2
		53,73 8	50,46 11	51,76 8	48,44 7	50,07 8	46,65 8
30 min	6	3,27 -3 Sem derrame		3,32 1 Sem derrame		3,42 0 Sem derrame	
		-65,10 4	-57,47 4			-67,60 4	-58,90 4
		-19,78 2	-21,13 2			-20,13 2	-21,18 2
		35,81 2	34,51 2			35,57 2	34,33 2
		50,45 2	45,95 8			51,58 8	46,62 8
30 min	6	4,5 0 Sem derrame				4,96 0 Sem derrame	

Nota Bien

(1) Para o Cl^- a influência da tricaína é de difícil determinação sem mais calibrações, mas para $\pm 65 \mu m$, que foi o eléctrodo seleccionado para as medições, não existe parece existir influência. Assim, não é necessário fazer as calibrações com tricaína.

(2) Para o Na^+ a influência da tricaína é de cerca de 3 a 5 unidades no declive de Nernst (sem tricaína valor é sempre superior), mas todos os valores mantêm-se dentro do intervalo de calibração de $56-58 \pm 11$ mV/década, por isso não é necessário fazer as calibrações com tricaína.

1º DIA - PRÉ - HIBRIDAÇÃO

- 1- Rehidratar os embriões: 100% MeOH, 75%, 50%, 25% MeOH/PBT e PBT X 2 (passagens de 5-10 min.)
- 2- Peróxido de Hidrogénio 6% em PBT durante 1h. Manter tapado. (R.T.)
- | H ₂ O ₂ | PBT | TOTAL |
|-------------------------------|-----|-------|
| 10 | 40 | 50 |
- 3- Lavar 3x 5' em PBT (R.T.).
- 4- Incubar com Proteinase K a 1 µg/ml (de 0' a 15' RT) (stock a 10mg/ml: 50µl PK - 50ml PBT)
- 5- Lavar com Glicina (2 mg/ml em PBT) preparada fresca. (0.1g - 50ml PBT)
- 6- Pós-Fixar: PFA 4% + 0.2% Glutaraldeído - 20' à RT

PFA 4%	Glutaraldeído 25%
50 ml	400 µl

- 7- Lavar 2x5' em PBT
- 8- Substituir o PBT por Tampão de Hibridação.

60% Formamida	6 ml	Formamida	(100% stock)
5xSSC	2.5 ml	20xSSC pH 6	(20x stock)
Tween20 10%	0.2 ml	Tween20 10%	(10% stock)
500 µg/ml tRNA	500 µl	tRNA	(10 mg/ml)
50 µg/ml heparina	12.5 µl	heparina	(40 mg/ml)
H ₂ O	0.79 ml	H ₂ O	
TOTAL	10 ml		

- 9- Pré-Hibridar a 68-70°C durante 3 h. (mínimo 2h).
- 10- Eliminar o Tampão de Hibridação e adicionar a sonda (1 µl Transcrição – 100 ml de T.H.)
- 11- Hibridar na estufa O.N. (68-70°C).

2º DIA - ANTICORPO

- 1- Lavar 2 x 60 min em SOL I (pré-aquecida à temperatura de hibridação: 68-70°C).
- 2- Lavar 2 x 30 min em SOL III a 65°C (pré-aquecida: 68-70°C).

Sol I:	Sol III:
Formamida	Formamida
SSC 20x pH 4.5	SSC 20x pH 4.5
Tween20 10%	Água
Água	Água
50 ml	50 ml
20 ml	10 ml
2 ml	40 ml
28 ml	100 ml
100 ml	

2º DIA - ANTICORPO (cont.)

- 3- 2 x 5' em MABT sem levamisole.
- | | |
|---------------|---|
| MAB 5x: | MABT: |
| Ácido Maleico | Diluir a 1x a partir do MAB 5x |
| NaCl | 43.5 g |
| | Acrescentar 10ml de Tween-20 a 100% por cada litro de 1xMAB |
- Água até 800 ml, ajustar pH a 7,5 (com NaOH). Água até 1 litro
- 4- Bloqueio em: MABT/10% FCS/ 2% Blocking Reagent - 2-3 horas RT
- 5- Incubar a 4°C ON em anti-DIG-anti-FLUO diluído de 1:2000/1:4000 na solução de bloqueio.

3º DIA - LAVAGENS

- 1- Lavar 3 x 5' em MABT + 2mM levamisole (0.4816g/l) e depois de hora a hora (aprox.) à R.T.
- 2- Lavar 3 x 10' com NTMT.

NTMT	100 ml
TrisHCL 1M pH 9.5	10 ml
MgCl ₂ 1M	5 ml
NaCl 5M	2 ml
Tween-20 a 10%	1 ml
Água	82 ml

- 3- Adicionar o substrato de revelação.
BM-purple

- 4- Parar a reação com PBT (2 x 30').
- 5 - Fixar ON. Guardar em PBT/1%Ázida a 4°C.

PBT	
1xPBS	Tween-20 a 100%
1000 ml	1 ml